

JACKELINE TERTO DA SILVA SANTANA

**ANÁLISE MOLECULAR EM VARIEDADES BOTÂNICAS DE *Hancornia speciosa*
Gomes (Apocynaceae)**

RECIFE - PE

2018

JACKELINE TERTO DA SILVA SANTANA

**ANÁLISE MOLECULAR EM VARIEDADES BOTÂNICAS DE *Hancornia speciosa*
Gomes (Apocynaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Melhoramento Genético de Plantas da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Agronomia, na área de concentração Melhoramento Genético de Plantas.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Professor Dr. Edson Ferreira da Silva -Orientador - UFRPE

Professor Dr. Cícero Carlos de Souza Almeida - Coorientador - UFAL

ANÁLISE MOLECULAR EM VARIEDADES BOTÂNICAS DE *Hancornia speciosa*
Gomes (Apocynaceae)

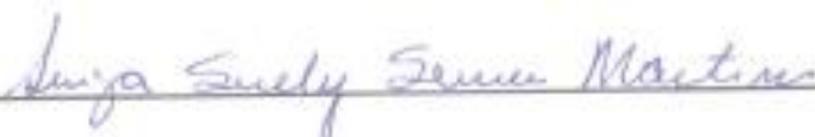
JACKELINE TERTO DA SILVA SANTANA

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em 05/03/2018

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Edson Ferreira da Silva
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE
Orientador



Prof. Dra. Luza Suelly Samen Martins
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE
Examinador interno



Prof. Dr. Luiz Gustavo Rodrigues Souza
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE
Examinador externo

RECIFE - PE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

S232a Santana, Jackeline Terto da Silva.
Análise molecular em variedades botânicas de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae) / Jackeline Terto da Silva Santana. -- Recife, 2018.
55 f.: il.

Orientador(a): Edson Ferreira da Silva.
Coorientador(a): Cícero Carlos de Souza Almeida.
Dissertação (Mestrado em Agronomia - Melhoramento Genético de Plantas) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife, 2018.
Inclui referências e apêndices.

1. Mangabeira 2. cpDNA 3. DNA barcoding 4. Taxonomia
I. Silva, Edson Ferreira da, orient. II. Almeida, Cícero Carlos de Souza, coorient. III. Título

CDD 631.53

És fruta de carne acesa,
sempre em agraz,
como araçás, guabirabas,
maracujás.

Também **MANGABA**,
deixas em quem te conhece
visgo, borracha.

João Cabral de Melo Neto

Àqueles que enxergam a ciência
como uma fonte inesgotável de sabedoria.

OFEREÇO

Aos meus pais, José Izaias e Cícera Terto,
à minha irmã, Joelma Terto
e ao meu namorado Sérgio Rogério.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Deus por ser infinitamente perfeito em tudo que faz.

Ao meu orientador Prof. Dr. Edson Ferreira da Silva pela confiança e oportunidade de elaborar este trabalho e ao meu coorientador Prof. Dr. Cícero Carlos de Souza Almeida pela amizade, dedicação e comprometimento com a pesquisa, meu sincero e humilde obrigada!

À Prof^ª. Dra. Luiza Suely Semen Martins e ao Prof. Dr. Luiz Gustavo Rodrigues Souza pela disponibilidade em fazer parte da banca examinadora e muito contribuir na melhoria deste trabalho.

Aos meus pais, José Izaias e Cícera Terto, por sonhar, vibrar e se orgulhar a cada degrau alcançado ao longo de minha vida acadêmica. Amo vocês de forma inimaginável!

A minha irmã e amiga, Joelma Terto, pelos incentivos, apoio e conselhos. Eis uma pessoa que acredita mais em mim que eu mesma! Amo você!

Ao meu melhor amigo e namorado, Sérgio Rogério, pelo companheirismo, apoio e dedicação. Obrigada por ser meu fiel conselheiro durante a realização deste trabalho. Não teria conseguido sem sua ajuda.

Aos meus colegas do Laboratório de Genética de Populações: Vanessa, Ieda, Luiz Sérgio, Danielson, Ana Kelly, Alisson, muito obrigada!

À Universidade Federal de Alagoas – *Campus Arapiraca*, mais precisamente ao Laboratório de Recursos Genéticos, pelo acolhimento e oportunidade de fazer pesquisa: Eliane, Suzyane, Cleide, Richard, Júnior, Gleica, Tatiana, Iara, Lindaiane, André, Cida, Elvia, Thomáz, Bruna, Grazielly, Danielly e Everton. Grata pelo apoio e recepção de todos vocês!

Aos professores da Universidade Federal Rural de Pernambuco pelos ensinamentos transmitidos. Em especial ao Prof. Dr. José Luiz Sandes de Carvalho Filho, Prof^ª. Dra. Luiza Suely Semen Martins e ao Prof. Dr. Gerson Quirino Bastos, pela maneira fantástica de transmitir ciência. Obrigada!

Ao Prof. Dr. Lázaro José Chaves por nos receber com muito entusiasmo na Coleção de Germoplasma de Mangabeira da Universidade Federal de Goiás e ao MSc Josué Francisco da Silva Júnior pela disponibilidade de materiais de pesquisa. MUITÍSSIMO obrigada!

À CAPES pela concessão da bolsa de pesquisa e ao CNPq por financiar este trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

μL - microlitro

CBOL – Consortium for the Barcode of Life

cpDNA – Cloroplast DNA

DNA – Desoxyribonucleic Acid

GPS – sistema de posicionamento global

M – marcador molecular

NCBI – National Center for Biotechnology Information

pb – pares de base

PCR – reação em cadeia da polimerase

PWG – Plant Working Group for Barcoding

Taq – Taq DNA polymerase

var – variedade

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Fruto e folhas de variedadesotânicas de *Hancornia speciosa* Gomes (mangabeira). A= var. *cuyabensis*; B= var. *gardneri*; C= var. *pubescens* e D= var. *speciosa*. FONTE: CHAVES, L. J. (comunicação pessoal).....26.
- Figura 2.** Distribuição geográfica de *Hancornia speciosa* Gomes (mangabeira). FONTE: GBIF (2018).29.
- Figura 3.** Genoma de cloroplasto de *Hancornia speciosa* Gomes (mangabeira). Dados não publicados. FONTE: OLIVEIRA, E. J. S.....32.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	18
REVISÃO DE LITERATURA	18
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	19
2. TAXONOMIA DO GÊNERO <i>Hancornia</i>	20
3. ASPECTOS GERAIS DA MANGABEIRA (<i>Hancornia speciosa</i> Gomes).....	21
3.1. VARIEDADES BOTÂNICAS DE <i>Hancornia speciosa</i>	22
3.2. ATRIBUTOS ECOLÓGICOS, SOCIAIS E ECONÔMICOS	26
4. DISTRIBUIÇÃO E CENTROS DE DIVERSIDADE	28
5. DNA BARCODING E ESTUDOS FILOGENÉTICOS EM PLANTAS	30
6. FILOGENIA E SUAS IMPLICAÇÕES NO MELHORAMENTO GENÉTICO.....	34
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
CAPÍTULO II	42
MANUSCRITO	42
Resumo	43
Introdução	43
Material e métodos	44
Resultados e discussão	45
Conclusão	48
Agradecimentos	48
Referências	49

RESUMO GERAL

O gênero *Hancornia* é monotípico cuja espécie se denomina *Hancornia speciosa* Gomes (mangabeira). Trata-se de uma frutífera nativa do Brasil que desempenha relevante papel no mercado de fruticultura tropical. São descritas seis variedades botânicas de acordo com diferenças morfológicas: var. *speciosa*, var. *pubescens*, var. *gardneri*, var. *maximiliani*, var. *lundii* e var. *cuyabensis*. No entanto, a dificuldade em distingui-las em populações naturais sugere que essas variedades botânicas constituam variações devido a adaptações ecológicas. Nesse sentido, a construção da filogenia do gênero permite elucidar a classificação taxonômica. Entre os métodos moleculares, o uso de regiões padrões (DNA barcoding) caracteriza-se por ser segura e promissora em estudos filogenéticos. Esta pesquisa teve como objetivo estudar a filogenia do gênero *Hancornia* usando sequências plastidiais (*trnH-psbA*, *rbcL* e *matK*). Folhas foram coletadas nos Estados de Sergipe, Pernambuco, Paraíba, Maranhão, Ceará, Bahia, Goiás, Minas Gerais e na Coleção de Germoplasma da Universidade Federal de Goiás. O DNA foi devidamente extraído e as reações de PCR e sequenciamento das regiões do genoma de cloroplasto foram realizadas. A região intergênica *trnH-psbA* identificou onze haplótipos. A árvore filogenética mostrou a formação de dois clados: um para a variedade *speciosa* e outro para *pubescens*, *gardneri* e *cuyabensis*, demonstrando que estas últimas são mais próximas geneticamente. Resultado semelhante foi obtido na análise de componentes principais onde revela que *speciosa* forma um agrupamento distinto das demais variedades estudadas. Este fato pode ser consequência de um isolamento por distância já que esta variedade ocorre somente na Mata Atlântica e Caatinga. Dessa forma, a relação evolutiva entre as variedades evidencia a formação de dois grupos genéticos, um para *speciosa* e outro para *gardneri*, *cuyabensis* e *pubescens*, sendo revelado que *gardneri* possivelmente é um híbrido natural entre *cuyabensis* e *pubescens*. Além disso, comprova-se a inexistência das variedades *maximiliani* e *lundii*, mostrando ser apenas variações devido ao ambiente. Portanto, somente três variedades botânicas devem ser consideradas para *H. speciosa*: *pubescens*, *cuyabensis* e *speciosa*.

Palavras-chave: Mangabeira. cpDNA. DNA barcoding. Taxonomia.

GENERAL ABSTRACT

The genus *Hancornia* is monotypic whose species is called *Hancornia speciosa* Gomes (mangabeira). It is a fruit native to Brazil that plays a relevant role in the tropical fruit market. Six botanical varieties are described according to morphological differences: var. *speciosa*, var. *pubescens*, var. *gardneri*, var. *maximiliani*, var. *lundii* and var. *cuyabensis*. However, the difficulty in distinguishing them in natural populations suggests that these botanical varieties are variations due to ecological adaptations. In this sense, the construction of the phylogeny of the genus allows to elucidate the taxonomic classification. Among molecular methods, the use of standard regions (DNA barcoding) is characterized by being safe and promising in phylogenetic studies. This study aimed to study the phylogeny of the genus *Hancornia* using plastid sequences (*trnH-psbA*, *rbcL* and *matK*). Leaves were collected in the States of Sergipe, Pernambuco, Paraíba, Maranhão, Ceará, Bahia, Goiás, Minas Gerais and in the Germplasm Collection of the Federal University of Goiás. DNA was duly extracted and PCR reactions and sequencing of genome chloroplast were performed. The *trnH-psbA* intergenic region identified eleven haplotypes. The phylogenetic tree showed the formation of two clades: one for *speciosa* variety and one for *pubescens*, *gardneri* and *cuyabensis*, demonstrating that the latter are genetically closer. A similar result was obtained in the principal component analysis where it reveals that *speciosa* forms a distinct grouping of the other varieties studied. This fact may be a consequence of isolation by distance since this variety occurs only in the Atlantic Forest and Caatinga. Thus, the evolutionary relationship between the varieties evidences the formation of two genetic groups, one for *speciosa* and another for *gardneri*, *cuyabensis* and *pubescens*, and it was revealed that *gardneri* possibly a natural hybrid between *cuyabensis* and *pubescens*. In addition, the absence of the varieties *maximiliani* and *lundii* is shown, showing only variations due to the environment. Therefore, only three botanical varieties should be considered for *H. speciosa*: *pubescens*, *cuyabensis* and *speciosa*.

Key words: Mangabeira. cpDNA. DNA barcoding. Taxonomy.

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

1. INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Hancornia* pertence à família Apocynaceae e possui uma única espécie denominada *Hancornia speciosa* Gomes (mangabeira). Trata-se de uma espécie frutífera nativa do Brasil de grande importância no cenário de fruticultura tropical por produzir uma das mais importantes matérias-primas para a agroindústria de polpas, sucos e sorvetes, desempenhando um relevante papel econômico e social (SILVA JÚNIOR & LÊDO, 2006).

Com base em diferenças morfológicas nas flores e folhas, são descritas seis variedades botânicas: *H. speciosa* var. *speciosa* Gomes; *H. speciosa* var. *maximiliani* A. DC., *H. speciosa* var. *cuyabensis* Malme, *H. speciosa* var. *lundii* A. DC., *H. speciosa* var. *gardneri* (A. DC.) Muell. Arg. e *H. speciosa* var. *pubescens* (Nees. et Martius) Muell. Arg (MONACHINO, 1945). No entanto, algumas variedades apresentam distribuição simpátrica, considerável variação morfológica entre populações e ainda possuem indivíduos com características fenotípicas intermediárias (COLLEVATTI et al., 2016; FLORES et al., 2018), impossibilitando uma identificação precisa e segura.

De maneira geral, a variedade *speciosa*, típica do Nordeste, apresenta uma diferenciação morfológica singular em relação às demais, possuindo folhas pequenas (cerca de 6 cm de comprimento e 2 cm de largura) e fruto de coloração amarela com manchas avermelhadas e formato oblongo. Diferentemente das demais que, no geral, possuem folhas maiores (variando de 6 a 12 cm de comprimento e 3 a 7 cm de largura) e frutos de coloração verde acentuado ou verde claro com formato oblongo ou redondo, a depender da variedade (MONACHINO, 1945; GANGA et al., 2010). O fato de a variedade *speciosa* possuir características peculiares pode ser consequência de um mecanismo de isolamento por distância. Além disso, a distinção entre as variedades é de caráter qualitativo, sugerindo a possibilidade de considerar um caráter monogênico ao invés de diferentes variedades (CHAVES, 2006).

Nesse sentido, estudos acerca do fenótipo em associação com pesquisas moleculares tornam-se extremamente importantes para construir a filogenia das variedades descritas para mangabeira, possibilitando uma melhor compreensão de

sua história evolutiva. Trabalhos visando à caracterização morfológica (GANGA et al., 2010; FREITAS et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2014) e molecular, por meio de marcadores de DNA (MOURA et al., 2011; SILVA et al., 2011; COSTA et al., 2011; SILVA et al., 2012; AMORIM et al., 2015; COSTA et al., 2017; MAIA et al.; 2017) trazem informações relevantes acerca da diversidade e variabilidade genética existente na espécie, porém, ainda são insuficientes para elucidar, de fato, a existência de diferentes variedades botânicas descritas. Com este intuito, nesta pesquisa, as relações entre as variedades de *H. speciosa* foram estudadas através da filogenia molecular.

2. TAXONOMIA DO GÊNERO *Hancornia*

Em 1812, Bernadino Antônio Gomes identificou a mangabeira como *Hancornia speciosa* (SILVA JÚNIOR & LÊDO, 2006) que, de acordo com o Angiosperm Phylogeny Group IV - APG IV (2016), está inserida nos seguintes táxons: Reino Plantae, Divisão Magnoliophyta, Classe Magnoliopsida, Subclasse Asteridae, Ordem Gentianales, família Apocynaceae.

O gênero *Hancornia* é caracterizado por ser monotípico e a espécie única é denominada *Hancornia speciosa*. Para esta espécie são descritas seis variedades botânicas de acordo com a revisão sobre o gênero *Hancornia* realizada por Monachino (1945), são elas:

- *H. speciosa* var. *speciosa* Gomes;
- *H. speciosa* var. *maximiliani* A. DC;
- *H. speciosa* var. *cuyabensis* Malme;
- *H. speciosa* var. *lundii* A. DC;
- *H. speciosa* var. *gardneri* (A. DC.) Muell Arg;
- *H. speciosa* var. *pubescens* (Nees. et Martius) Muell Arg.

3. ASPECTOS GERAIS DA MANGABEIRA (*Hancornia speciosa* Gomes)

A mangabeira está entre as primeiras espécies frutíferas relatadas por Gabriel Soares de Souza, um dos cronistas mais importantes da época colonial, que em seu “Tratado descritivo do Brasil”, de 1587, relatou a mangabeira da seguinte maneira:

“Na vizinhança do mar da Bahia se dão umas árvores nas campinas e terras fracas, que se chamam mangabeiras, que são do tamanho de pessegueiros... O fruto é amarelo, corado de vermelho, como pêssegos calvos, ao qual chamam mangabas; que são tamanhas como ameixas e outras maiores, as quais em verde são tôdas cheias de leite, e colhem-se inchadas para amadurecerem em casa, o que fazem de um dia para o outro, porque se amadurecem na árvore caem no chão”.

In: Tratado Descritivo do Brasil, capítulo 52, em que se diz de algumas árvores de fruto que se dão na vizinhança do mar da Bahia, de 1587, por Gabriel Soares de Souza.

O conhecimento acerca da espécie permite afirmar que a mangabeira é uma árvore frutífera originária do Brasil e encontrada em várias regiões. É popularmente conhecida como mangabeira, mangaíba, mangaúva, mangareíba, mangava, manguba, mangabeira-agreste, mangabeira-brava, mangaba-das-caatingas, mangainha-das-caatingas, mangabeira-mansa, mangabeira-ovo, mangabeira-rana, mangabeira-branca, mangabeira-vermelha, mangabeira-de-Goiás, tembiú, tembiucatinga, catu, mangaíba-uva, mangabiba, mangabeira-de-Minas, fruta-de-doente, mambaga, mangabeira-do-norte, mangabeira-do-cerrado (AGOSTINI-COSTA, 2006; SILVA JÚNIOR & LÊDO, 2006).

A mangabeira é uma espécie que apresenta bom desenvolvimento em regiões de clima tropical com temperatura média de 24°C e 26°C, ocorrendo, sobretudo, em áreas constituídas de vegetação aberta (cerrados, cerradões, tabuleiros e restingas), embora também encontrada em zonas com temperaturas mínimas e máximas de 15°C e 43°C, respectivamente. Seu crescimento vegetativo ocorre de maneira mais significativa nas épocas com temperatura elevada e pluviosidade entre 750 mm e 1.600 mm anuais, sendo tolerante a períodos de déficit hídrico. É encontrada em várias altitudes, desde o nível do mar até em áreas de 1500 m (SILVA JÚNIOR, 2003; SILVA JÚNIOR & LÊDO, 2006).

Geralmente, desenvolve-se em solos considerados pobres e ácidos, acidentados, arenosos ou areno-argilosos, predominantes de regiões do cerrado, tabuleiros costeiros e baixada litorânea, indo desde os neossolos quartzarênicos (áreas quartzosas) até os argissolos e latossolos (LEDERMAN et al., 2000). No cerrado, as mangabeiras ocorrem em formações abertas, nas encostas pedregosas (ALMEIDA et al., 1998).

3.1. VARIEDADES BOTÂNICAS DE *Hancornia speciosa*

Sabe-se que o aspecto das variedades de mangabeira encontradas no Cerrado é diferenciado em relação àquelas encontradas na Caatinga e Mata Atlântica. No entanto, de maneira geral, a espécie é considerada uma árvore de porte médio, em que varia de 2 a 10 m de altura, podendo atingir até 15 m. Possui crescimento lento, copa ampla (às vezes mais espalhada que alta) e numerosos ramos separados, definidos e bem formados, de córtice levemente suberoso e lisos de até 1 ano de idade, curtos, com poucas folhas, floríferos no ápice. Apresenta caule rugoso e áspero geralmente único (podendo haver bifurcações na altura média de 40 a 50 cm da base), sendo tortuoso ou reto, com 0,2 a 0,3 m de diâmetro. Toda a planta exsuda látex de cor branca ou róseo-pálida (MONACHINO, 1945; LEDERMAN et al., 2000).

A planta é decídua ou semi-decídua (SILVA JÚNIOR & LÊDO, 2006; AGOSTINI-COSTA, 2006), havendo troca em suas folhas durante o período mais seco do ano. As folhas medem 5 a 12 cm de comprimento e 1,5 a 6 cm de largura, possuem um brilho considerável, são simples, alternas e opostas, de forma e tamanho variado, são elípticas, oblongo ou elíptico-lanceoladas nas suas extremidades, às vezes obtuso no ápice, pubescentes ou glabras (dependendo da variedade), oliváceo, mais descoradas na dorsal e com pecíolo variando de tamanho de acordo com a variedade (medindo entre 3 mm a 12 mm de comprimento), axilar, fino, glabro, bianguloso (MONACHINO, 1945; SILVA et al., 2001).

Sua inflorescência é do tipo dicásio constituída normalmente de 1 a 7 flores, podendo ocorrer até 10. As flores são hermafroditas, com aroma peculiar, coloração branca e formato tubular, podendo apresentar tricomas internamente. As flores são

gêmeas ou trigêmeas no ápice dos râmulos, possuem pedicelos de 6 mm a 8 mm de comprimento que desaparecem junto ao cálice. Este, por sua vez, é glabro ou pubescente, com lacínias ovais, de margem ciliada. A corola mede 3 a 4 cm, possuindo tubo milimétrico em largura com o triplo do comprimento dos lobos. O androceu possui 5 estames, epipétalos; anteras lanceoladas, com aproximadamente 2 mm de comprimento, de filetes curtos e deiscência rimosa. O gineceu possui ovário pequeno (aproximadamente 2 mm de comprimento) unicarpelar, pluriovular e glabro; estilete longo (2,5 cm comprimento) com estigma típico da família (em carretel) (MONACHINO, 1945; ALMEIDA et al., 1998; KINOSHITA, 2005).

Seu fruto é conhecido como mangaba cuja origem indígena (mã' gawa) significa "coisa boa de comer". É do tipo baga podendo ser elipsóide ou arredondado, medindo entre 2,5 e 6 cm, podendo haver frutos de diferentes tamanhos por planta e por variedade. Possui massa variando de 5 g a 50 g na Caatinga e Mata Atlântica (AGUIAR FILHO et al., 1998) e de 30 a 260 g no Cerrado (SILVA et al., 2001) com exocarpo amarelo com manchas avermelhadas, verde acentuado ou verde-claro (dependendo da variedade). A polpa é bastante doce, carnosu-viscosa, ácida, contendo de 2 a 15 ou até 30 sementes castanho claras, delgadas e rugosas e discóides medindo de 7 mm a 8 mm de diâmetro (MONACHINO, 1945; GANGA et al., 2010).

O sistema reprodutivo da mangabeira foi estudado por Darraut & Schlindwein (2005) onde foi constatado que se trata de uma espécie alógama e autoincompatível. De acordo com os autores, as flores da mangabeira possuem uma morfologia que conferem à planta um mecanismo eficiente que favorece a polinização cruzada. Mais tarde, Collevatti et al. (2016) realizaram estudos sobre fluxo gênico na espécie e seus resultados comprovam a autoincompatibilidade.

Dessa forma, há necessidade de diferentes genótipos da espécie e polinizadores específicos para que haja fecundação cruzada e posterior formação dos frutos. Os polinizadores da mangabeira são de diferentes grupos taxonômicos: famílias Sphingidae, (abelhas do gênero *Euglossini*), Hesperidae e Nymphalidae (gênero *Heliconius*) (DARRAUT & SCHLINDWEIN, 2005). Estudos realizados por Darraut & Schlindwein (2006) demonstraram que dentre a lista dos visitantes florais em mangabeira foram encontrados 77 insetos, sendo 33 de espécies

diferentes. Dentre eles, 11 foram espécies de abelhas da ordem Hymenoptera e 23 da ordem Lepdoptera.

Descrições morfológicas são comumente usadas para diferenciar as seis variedades de *H. speciosa*. Dentre as quais, destacam-se: altura da planta; comprimento foliar e peciolar; ausência/presença de pubescência nas folhas, comprimento, formato, coloração dos frutos e épocas de frutificação.

No entanto, as definições existentes para distinguir as variedades são advindas da revisão sobre o gênero *Hancornia* realizada por Monachino (1945). Para o autor, as diferenças entre as variedades referem-se, principalmente, às folhas (Figura 1) e à flor:

H. speciosa var. *speciosa* possui pecíolo de 9 a 15 mm de comprimento; limbo com cerca de 6 cm de comprimento e 2 cm de largura; glabra; pedicelos glabros; cálice glabro ou raramente pubescente externamente.

H. speciosa var. *maximiliani* caracteriza-se por ter seu limbo com comprimento e largura um pouco menor e o pecíolo um pouco mais curto que a variedade típica (var *speciosa*); pecíolo com cerca de 8 mm de comprimento; limbo de 5 a 6 cm de comprimento e 2,0 a 2,5 cm de largura.

H. speciosa var. *lundii* possui pecíolo com 3 a 5 mm de comprimento; limbo com 5 a 7 cm de comprimento e 3 cm de largura; pedicelos pubescentes; cálice cerdoso-pubescente externamente; corola com lóbulos pubescentes externamente.

H. speciosa var. *gardneri* possui pecíolo curto como a variedade *lundii*; limbo com 7 a 10 cm de comprimento e cerca de 4 cm de largura, glabro na face dorsal ou pubescente na parte inferior da nervura central.

H. speciosa var. *pubescens* possui ramos densamente pubescentes; pecíolo curto como nas variedades *gardneri* e *lundii*, pubescente; limbo pubescente na parte inferior, com 6 a 12 cm de comprimento e 3 a 6 cm de largura; corola maior com lóbulos cerdoso-pubescentes, tubo pubescente externamente.

H. speciosa var. *cuyabensis* caracteriza-se por possuir pecíolo com cerca de 3 mm de comprimento; limbo de 4 a 10 cm de comprimento e 1,5 a 3,0 cm de largura; cálice glabro externamente; corola grande, glabra externamente.

Ganga et al. (2009) realizaram estudos estimando parâmetros genéticos em progênies de *H. speciosa* do Cerrado e concluíram que dentre quatro variedades estudadas, as variedades *gardneri* e *cuyabensis* apresentam maior desenvolvimento em campo em relação ao diâmetro do caule e altura da planta.

O valor dos recursos genéticos de uma espécie está estritamente relacionado com a magnitude da variabilidade genética disponível (CHAVES, 2006). Nesse sentido, *H. speciosa* requer maiores informações sobre a variabilidade e diversidade genética existente para as diferentes variedades descritas. Alguns trabalhos voltados para a caracterização baseada em aspectos morfológicos (GANGA et al., 2009, 2010; FREITAS et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2014) e através de marcadores de DNA (MOURA et al., 2011; SILVA et al., 2011; COSTA et al., 2011; SILVA et al., 2012; AMORIM et al., 2015; NOGUEIRA et al., 2015; MAIA et al., 2017; COSTA et al., 2017) foram realizados, porém é evidente a necessidade de um estudo filogenético com um enfoque molecular para entender a organização das variedades dentro do gênero.

De acordo com Ganga et al. (2010) as variedades *pubescens* e *gardneri* possuem frutos redondos e verde-claros (Figura 1). Essas informações atreladas ao fato de que a única diferença morfológica entre elas é de caráter qualitativo, isto é, folhas pubescentes e glabras, respectivamente (MONACHINO, 1945), sugerem a possibilidade de não considerar duas variedades diferentes já que não há restrição ao fluxo gênico entre elas (COLLEVATI et al., 2016).

A variedade típica da Caatinga e Mata Atlântica (var *speciosa*) possui frutos bem singulares que, apesar de serem menores que os das demais variedades, apresentam uma coloração amarela com manchas avermelhadas e um formato oblongo (SILVA JÚNIOR & LÊDO, 2006; GANGA et al., 2010), além de folhas bem menores (MONACHINO, 1945) (Figura 1). Para Chaves (2006), a discrepância entre *speciosa* e as demais variedades botânicas deve-se a um mecanismo de isolamento por distância.

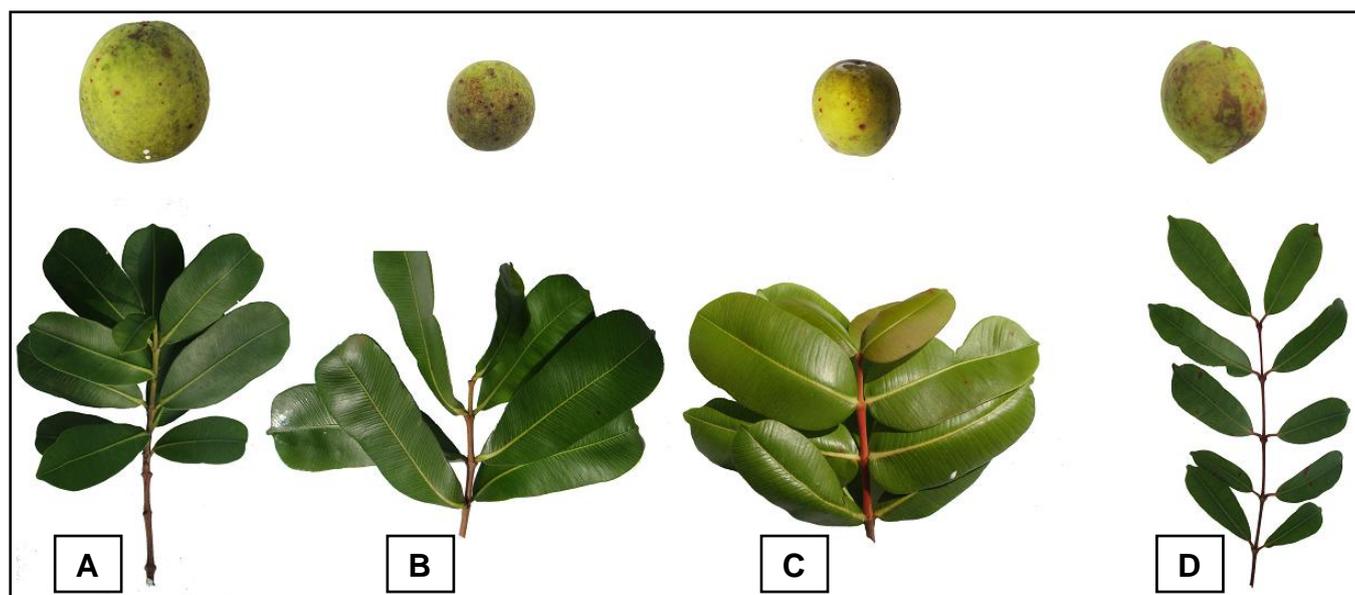


Figura 1. Fruto e folhas de variedades botânicas de *Hancornia speciosa* Gomes (mangabeira). A= var. *cuyabensis*; B= var. *gardneri*; C= var. *pubescens* e D= var. *speciosa*. **FONTE:** CHAVES, L. J. (comunicação pessoal).

Apesar de Collevatti et al. (2016) afirmarem não haver restrição ao fluxo gênico nas variedades estudadas (var *speciosa*, var *cuyabensis*, var *gardneri* e var *pubescens*) ainda fica a lacuna sobre as variedades *maximiliani* e *lundii*, que não foram incluídas no trabalho. Isto permite inferir o seguinte questionamento: Os diferentes aspectos morfológicos são suficientes para definir a existência de variedades botânicas em mangabeira?

3.2. ATRIBUTOS ECOLÓGICOS, SOCIAIS E ECONÔMICOS

A espécie *H. speciosa* é considerada uma frutífera de extrema importância para ecossistemas onde está presente, sobretudo por seus frutos servirem como alimento para diversas espécies animais (PEREIRA et al., 2006), além de constituir uma fonte de renda de muitas famílias que sobrevivem como “catadoras de mangaba” (SILVA JÚNIOR & LÊDO, 2006).

A variedade *speciosa* é a mais explorada para a produção de frutos, predominantemente na forma de extrativismo. No entanto, em trabalhos realizados com diferentes variedades de mangabeira, Ganga et al. (2010) demonstraram que

as variedades *gardneri* e *pubescens* destacam-se com maior potencial para a seleção baseada em caracteres de tamanho e peso dos frutos, pois são maiores e mais pesados. Dessa maneira, torna-se evidente a necessidade na obtenção de mais informações acerca da espécie e suas variedades, tendo em vista o interesse crescente da indústria.

De acordo com Lederman et al. (2000), os frutos da mangabeira não são somente apreciados por animais, mas também por populações humanas devido ao sabor agradável. Os frutos apresentam excelente valor nutritivo, sendo o teor de proteínas, de 0,7g/100g de polpa, superior ao da maioria das espécies frutíferas. O fruto também é rico em diversos outros nutrientes como as vitaminas A, B1, B2 e C, além de ferro, fósforo e cálcio. O elevado teor de ferro, cerca de 28mg/100g de polpa, faz com que a mangaba seja uma das frutas mais ricas neste mineral (SOARES et al., 2004).

O fruto da mangabeira tem uma vasta utilização, podendo ser consumido *in natura* ou ser utilizado na fabricação de produtos diversos: sucos, doces, geléias, vinho, sorvete, licores, vinagre (LEDERMAN et al., 2000). Essa vasta aplicabilidade na utilização de seus frutos permite afirmar que a mangabeira é uma frutífera de grande interesse na indústria (FERREIRA & MARINHO, 2007).

De acordo com Silva Júnior & Lêdo (2006), no Cerrado, o pico de produção de frutos ocorre de setembro a novembro. Na Caatinga e Mata Atlântica, entretanto, ocorrem duas frutificações ao longo do ano, o que caracteriza duas safras: uma de verão, que vai de dezembro a abril; e a outra de inverno, que vai de maio ao início de julho.

Além dos frutos, o látex da mangabeira também possui potencial para exploração comercial, pois é de excelente qualidade e tem uma plasticidade bastante elevada. Na Segunda Guerra Mundial, o látex da mangabeira foi muito explorado para fabricação de borracha (SOUSA et al., 2005). Adicionalmente, o látex tem atributos medicinais que vêm despertando cada vez mais o interesse de pesquisadores (BASTOS et al., 2017). Há diversos registros de sua utilização para tratamentos de tuberculose, dermatoses, úlceras, verrugas, cólicas menstruais (SOUSA et al., 2005).

4. DISTRIBUIÇÃO E CENTROS DE DIVERSIDADE

A mangabeira é uma planta considerada de ampla distribuição geográfica no Brasil. Fora dele, é praticamente desconhecida e sua presença é registrada apenas no Paraguai, Bolívia (a oeste) e, possivelmente, no Chaco da Argentina. Alguns autores afirmam que a espécie pode ser encontrada no Peru (a oeste) e Venezuela (a norte) (MONACHINO, 1945).

Em territórios brasileiros, pode ser encontrada desde o Estado do Amapá até São Paulo, estando associada, sobretudo, às vegetações de Campos de Restingas e Savanas (Cerrados) do interior e do litoral. Sua ocorrência também foi relatada no Paraná e no Amazonas em áreas não florestais (Figura 2) (MONACHINO, 1945).

Segundo Giacometti (1993), os principais centros de diversidade genética associados à mangabeira são: Costa Atlântica e Baixo Amazonas; Nordeste/Caatinga, sobretudo as áreas de tabuleiros e zonas de transição caatinga-cerrado; Brasil central/Cerrado; Mata Atlântica, nas áreas de savanas litorâneas e restingas, onde no Nordeste está presente na costa do Rio Grande do Norte a Alagoas e na Bahia/Espírito Santo/Vale do Rio Doce está presente no litoral de Sergipe ao Espírito Santo.

Sendo assim, pode-se afirmar que a mangabeira não é restrita a um só bioma, ao contrário de muitas espécies frutíferas nativas do Brasil (CHAVES, 2006). No litoral da região, populações nativas foram identificadas desde o Maranhão até divisa com Espírito Santo (MONACHINO, 1945) por se tratar de uma planta típica das áreas de Tabuleiros Costeiros e Baixada Litorânea, podendo ter ocorrência em todos os Estados do Nordeste.

Relatos descrevem a ocorrência de populações naturais de mangabeira ao longo dos Tabuleiros Costeiros, desde o sul da Bahia até o Ceará e no Estado do Pará. A ocorrência no norte de Minas Gerais, cento-oeste da Bahia, e no Estado do Tocantins, próximo às divisas com os Estados do Maranhão, Piauí e Bahia também foi relatada (SILVA JÚNIOR & LÊDO, 2006).

Entretanto, estudos mais aprofundados devem ser realizados acerca da ocorrência das diferentes variedades no país, sobretudo pela dificuldade na diferenciação e caracterização entre as mesmas. Além disso, muitos dos relatos

presentes na literatura estão baseados em um espaço geográfico distinto do atual ocasionado pelas modificações na paisagem mediante ações antrópicas.

A distribuição geográfica para as diferentes variedades de mangabeira tem como base a descrição realizada por Monachino (1945). Segundo ele, a variedade *speciosa* é a mais abrangente no Brasil e ocorre desde a região Sudeste até a região Norte.

Corroborando com esta informação, estudos no Cerrado do Centro-Oeste realizados por Rizzo & Ferreira (1985), registraram a ocorrência da variedade *speciosa* nas regiões de Goiás e Tocantins, próximas a Bahia, Piauí e Maranhão, podendo atingir a margem direita do rio Tocantins até a divisa com o Maranhão.



Figura 2. Distribuição geográfica de *Hancornia speciosa* Gomes (mangabeira). **FONTE:** GBIF (2018).

As demais variedades restringem-se ao bioma Cerrado. A presença da variedade *cuyabensis* foi relatada no Mato Grosso, mais especificamente na Chapada dos Guimarães, a *maximiliani* em Minas Gerais, a *pubescens* ocorre em Goiás e Minas Gerais, e a *gardneri* ocorre no Brasil Central, de modo que estas duas últimas variedades são encontradas nos mesmos lugares e muito próximas umas das outras. A variedade *lundii* ocorre nos Estados de Minas Gerais, Pernambuco, Bahia e Goiás (MONACHINO, 1945). Entretanto, César (1956), Blossfeld (1967) e Rizzo & Ferreira (1985), observaram a ausência da variedade

lundii no Estado de Goiás. A ocorrência da variedade *gardneri* no Estado de Goiás também foi relatada por Blossfeld (1967).

Diversos trabalhos continuam demonstrando a ampla distribuição de *H. speciosa* no Brasil, como, por exemplo, Ganga et al. (2010) relatam a ocorrência da espécie no Estado de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Bahia e Tocantins. Costa et al. (2017) apontam a presença de mangabeira no Centro-Oeste brasileiro, o que também foi observado por Moura et al. (2011) relatando várias populações no Estado de Goiás. Já em pesquisas realizadas em Estados nordestinos, Amorim et al. (2015) evidencia a amostragem de espécies oriundas do Ceará, Sergipe e Pernambuco, o que pode também ser verificado com estudos realizados por Maia et al. (2017) nos Estados do Maranhão, Sergipe, Pernambuco e Paraíba.

Embora os trabalhos relatem considerável variabilidade genética encontrada nas populações, bem como demonstrem ampla distribuição da espécie, as variedades *lundii* e *maximiliani* não são mencionadas. Diante disso, pesquisas capazes de esclarecer e comprovar quais as variedades, de fato, podem ser reconhecidas para mangabeira são extremamente importantes.

5. DNA BARCODING E ESTUDOS FILOGENÉTICOS EM PLANTAS

O DNA barcoding ou "códigos de barra de DNA" (HEBERT et al., 2003), consiste em um sistema único e universal com o objetivo de identificar organismos através da utilização de sequências de regiões específicas do DNA. As premissas desta tecnologia baseiam-se na amplificação via PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de sequências de DNA definidas, curtas e padronizadas (HEBERT et al., 2003; KRESS, 2017). O uso de sequências barcoding como alternativas moleculares para estudos filogenéticos é feito através da comparação entre sequências do material de interesse com aquelas depositadas em bancos de sequências obtidas de amostras bem identificadas e que possuem material testemunho acessível (JANZEN, 2003; KRESS, 2017).

De acordo com Hebert et al. (2003), o marcador mais utilizado é uma região do citocromo c oxidase mitocondrial (COI ou *cox1*), o mais empregado em estudos animais. Esse marcador, entretanto, não demonstrou sucesso em estudos vegetais

devido, principalmente, devido à rápida modificação de seu genoma, além de apresentar baixas taxas de substituição de bases no genoma mitocondrial. Dessa forma, houve a necessidade de buscar regiões barcoding alternativas para vegetais.

A célula vegetal possui três diferentes genomas: nuclear (*nDNA*), mitocondrial (*mtDNA*) e de cloroplasto (*cpDNA*), sendo os dois últimos de herança uniparental. No que se refere ao tamanho, o genoma de cloroplasto é o menor quando comparado ao genoma nuclear e mitocondrial e apresenta estrutura circular sendo representado por duas regiões: a *Large Single Copy Region* (LSC) e a *Small Single Copy Region* (SSC) interrompidas por duas cópias de *Large Inverted Repeats* (IRa e IRb) que codificam os mesmos genes (em direções opostas) (SHINOZAKI et al., 1986) (Figura 3).

Em plantas, o uso de regiões do genoma plastidial tem se mostrado uma ferramenta satisfatória para realização de estudos filogenéticos, devido, principalmente, sua fácil amplificação, tamanho pequeno, baixa taxa evolutiva e da maior conservação (em termos de tamanho, conteúdo, estrutura e ordem dos genes) observada entre os genomas em evolução conhecidos (PALMER, 1985; KRESS et al., 2008).

O sequenciamento de genes e de regiões não-codificantes do genoma de cloroplasto tem se tornado uma técnica muito promissora em estudos de filogenia (KRESS et al., 2008). As variações que ocorrem no genoma (mutações pontuais, rearranjos, incluindo deleções, inserções e inversões) são caracteres utilizados em estudos de filogenéticos.

Após um extenso inventário de regiões gênicas nos genomas mitocondrial, plastidial e nuclear (por exemplo, CHASE et al., 2005; KRESS et al., 2005; LAHAYE et al., 2008; NEWMASTER et al., 2008), quatro regiões primárias (*rbcL*, *matK*, *trnH-psbA* e ITS) geralmente têm sido aceitas como DNA barcoding na maioria dos estudos em plantas (CBOL, 2009; LI et al., 2015).

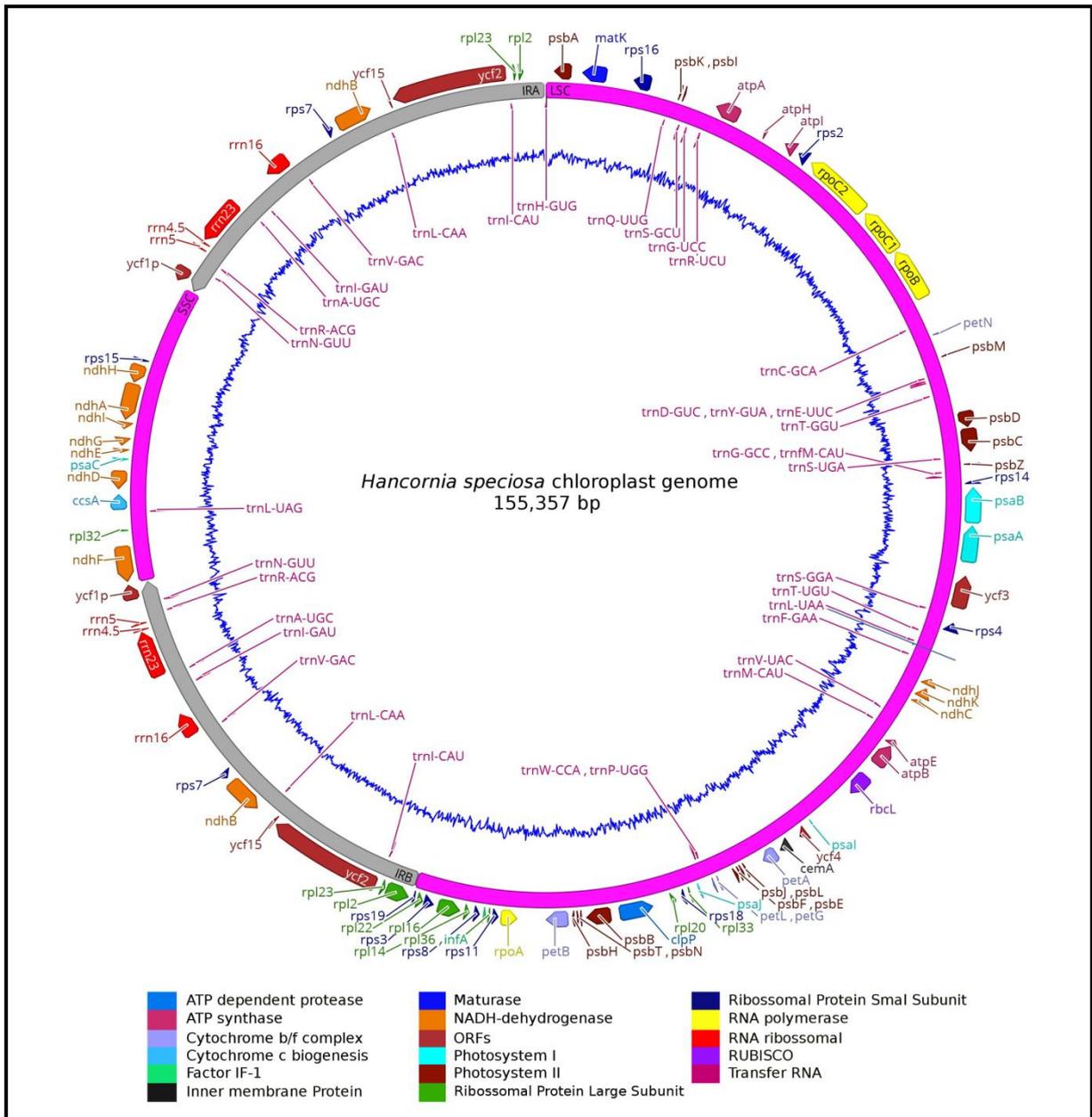


Figura 3. Genoma de cloroplasto de *Hancornia speciosa* Gomes (mangabeira). Dados não publicados. **FONTE:** OLIVEIRA, E. J. S.

De acordo com Hollingsworth et al. (2011), para que determinada região genômica seja usada como DNA barcoding é necessário que seja eficiente quanto à universalidade dos iniciadores (*primers*), qualidade e facilidade de amplificação e apresentar uma variabilidade ajustada a um alto poder discriminatório. Dessa forma, para plantas, inicialmente, foi estabelecido que somente as regiões *matK* (mais variável e de maior resolução) e *rbcl* (marcador de taxa evolutiva lenta e

conservada) deveriam ser utilizadas como regiões ideais usadas como barcoding e que a adição de outros *loci* seria desnecessário (LAHAYE et al., 2008; CBOL, 2009).

No entanto, a baixa resolução para a identificação molecular no nível de espécie e problemas com a amplificação de *matK* levaram a inclusão de uma região complementar, o espaçador intergênico não-transcrito denominado *trnH-psbA* (CBOL, 2009).

De acordo com Štorchová & Olson (2007), *trnH-psbA* é facilmente amplificado e sequenciado, além de apresentar alta variação de nucleotídeos, com comprimento entre 200-500 pb na maioria das espécies vegetais. Portanto, as regiões *matK*, *rbcL* e *trnH-psbA* são as mais utilizadas de acordo com as recomendações do CBOL (2009).

O gene *matK* codifica a proteína maturase K e o gene *rbcL* codifica a subunidade grande da ribulose-1,5- bifosfatocarboxilase/oxigenase (LAHAYE et al., 2008). O seguimento de *matK* utilizado em estudos com barcoding compreende 790 pb, aproximadamente. Trata-se de um gene utilizado como marcador na construção filogenética por ter demonstrado alto poder de distinção taxonômica nos níveis de ordem, família e gênero, principalmente por estar presente em todas as plantas e possuir rápida evolução. (HILU & LIANG, 1997; STOECKLE et al., 2011). O *rbcL* apresenta taxa de evolução lenta e bastante conservada (ZURAWSKI et al., 1981), por isso é comumente utilizado para fornecer dados filogenéticos.

Em plantas, a identificação de organismos com base em caracteres morfológicos requer conhecimentos taxonômicos específicos, pois se trata de uma prática minuciosa mediante sua importância. Além disso, classificação de indivíduos embasada somente no fenótipo (folhas, raízes, flores, pólen) se torna difícil (CBOL, 2009) quando se refere a características fenotípicas minuciosas e, portanto, passível a erros. Sendo assim, a utilização de DNA barcoding é considerada uma prática de identificação molecular segura e promissora (CBOL, 2009), revelando ser a ferramenta ideal para testar hipóteses filogenéticas.

Em suma, os resultados provenientes de estudos de DNA barcoding são extremamente úteis para gerar informações no contexto taxonômico baseado em caracteres morfológicos, podendo contribuir na formulação (e/ou reformulação) de hipóteses filogenéticas, de sistemas de classificação e também de limites

taxonômicos (SEBERG et al., 2003; TAUTZ et al., 2003; STACE, 2005; HOLLINGSWORTH et al., 2011).

6. FILOGENIA E SUAS IMPLICAÇÕES NO MELHORAMENTO GENÉTICO

A produção nacional de mangabeira, na sua grande maioria, é oriunda do extrativismo, mesmo perante a crescente busca pela indústria. Com isso torna-se imprescindível a obtenção de conhecimentos que possibilitem incrementar sua cadeia produtiva (SILVA JÚNIOR & LÊDO, 2006).

São modestos os números de acessos de mangabeira mantidos em coleções e bancos de germoplasma. Atualmente, existem coleções de mangabeiras, mantidas *ex situ* na Embrapa Cerrado e na Universidade Federal de Alagoas. Além disso, há um banco de germoplasma mantido na Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba (EMEPA) e de áreas de conservação *in situ* mantidas pela Embrapa Tabuleiros Costeiros (SILVA JÚNIOR, 2003). Na Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás há um banco de germoplasma implantado em 2005, abrangendo populações das variedades botânicas *pubescens*, *gardneri*, *speciosa* e *cuyabensis* (SILVA JÚNIOR, 2003; LÁZARO JOSÉ CHAVES, comunicação pessoal).

De maneira geral, de acordo com Yokomizo (2015), no melhoramento genético de mangabeira busca-se selecionar plantas que gerem frutos adequados para o cultivo comercial antes da abscisão da planta mãe, com as seguintes características:

- UNIFORMIDADE DE FRUTOS: tanto em termos de tamanho, formato, cor, brix e acidez, entre outros;
- SAFRA: definir época e sazonalidade, buscando-se ampliar o período de produção;
- RESISTÊNCIA DOS FRUTOS AOS DANOS MECÂNICOS/TRANSPORTE: frutos maduros apresentam textura delicada, danificando-se facilmente devido a ações mecânicas;

- ARQUITETURA/ALTURA DE PLANTA: obter plantas mais baixas com arquitetura menos alongada em sentido vertical, facilitando a colheita dos frutos;
- RESISTÊNCIA A DOENÇAS/INSETOS: obter menos perdas de plantas na área, que resultem em maior demanda por mão de obra e custo econômico de reposição;
- PRECOCIDADE: obter plantas que produzam com menor idade, permitindo retorno econômico antecipado;
- AUSÊNCIA DE LATEX: a produção de látex pela planta e sua presença nos frutos, pode dificultar a colheita antecipada, antes da abscisão do fruto da planta, pois ao se retirar o fruto do galho pode ocorrer escorrimento de látex sobre o fruto, podendo diminuir a qualidade do produto;
- PERSISTÊNCIA DE PLANTAS: obter a menor mortalidade de plantas na área, resistindo em maior intensidade a fatores edafoclimáticos desfavoráveis.

Um levantamento cienciométrico sobre *Hancornia speciosa* revela que dentre as lacunas no conhecimento sobre a espécie, a dificuldade em descrever e caracterizar as linhagens botânicas é um dos principais desafios encontrados (ALMEIDA et al., 2016). Nesse sentido, a identificação molecular através da técnica de DNA barcoding é uma prática altamente segura e promissora (CBOL, 2009), pois permite inferir relações evolutivas entre as diferentes variedades botânicas consideradas para *H. speciosa* e com isso muito pode corroborar no seu melhoramento genético, tanto direcionando cruzamentos entre as variedades, como auxiliando em medidas que propiciem um adequado manejo e conservação dos recursos genéticos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINI-COSTA, T. S.; SILVA, D. B.; VIEIRA, R. F.; SANO, S. M.; FERREIRA, F. R. Espécies de maior relevância para a região Centro-Oeste. In: VIEIRA; R. F.; AGOSTINI-COSTA; T. S.; SILVA; D. B.; SANO; S. M.; FERREIRA; F. R. (Eds.). **Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. Cap. 1, p. 15-30.
- AGUIAR FILHO, S. P. de; BOSCO, J.; ARAÚJO, I. A. **A mangabeira (*Hancornia speciosa*): domesticação e técnicas de cultivo**. João Pessoa: Emepa PB, 1998. 26 p. (Emepa-PB. Documentos, 24).
- ALMEIDA, L. M.; NOGUEIRA, C. A.; BORGES, P. P.; PRADO, A. D. L.; GONÇALVES, P. J. State of the art of scientific literature on *Hancornia speciosa*: trends and gaps. **Revista Brasileira de Fruticultura**, São Paulo, v. 38. n. 4, p. 1-10, 2016.
- ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. p. 247-281.
- AMORIM, J. A. E.; MATA, L. R.; LÉDO, A. S.; AZEVEDO, V. C. R.; SILVA, A. V. C. Diversity and genetic structure of mangaba remnants in states of northeastern Brazil. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 14. n. 1, p. 823-833, 2015.
- ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP (APG). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, Londres, v. 181, p. 1-20, 2016.
- BASTOS, K. X.; DIAS, C. N.; NASCIMENTO, Y. M.; SILVA, M. S.; LANGASSNER, S. M. Z.; WESSJOHANN.; TAVARES, J. F. Identification of phenolic compounds from *Hancornia speciosa* (Apocynaceae) Leaves by UHPLC Orbitrap-HRMS. **Molecules**, Basel, v. 22, n. 143, p. 1-11, 2017.
- BLOSSFELD, H. Mangabeira-de-goias. **Chácaras e Quintais**, São Paulo, v. 116, n.1, p. 14, 1967.
- CESAR, G. **Curiosidade de nossa flora**. Recife: Instituto Agronômico do Nordeste, 1956. 374p.
- CHASE, M. W.; SALAMIN, N.; WILKINSON, M.; DUNWELL, J. M.; KESANAKURTHI, R. P.; HAIDER, N.; SAVOLAINEN, V. Land plants and DNA barcodes: Short-term and long-term goals. **Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences**, London, n. 360, p. 1889–1895, 2005.
- CHAVES, L. J. Recursos genéticos no Cerrado. In: SILVA JUNIOR, J. F.; LÉDO, A. S. (Eds.). **A cultura da mangaba**. Aracajú: Embrapa Tabuleiros Costeiros. p. 157-163. 2006.

COLLEVATTI, R. G.; OLIVATTI, A. M.; TELLES, M. P. C.; CHAVES, L. J. Gene flow among *Hancornia speciosa* (Apocynaceae) varieties and hybrid fitness. **Tree Genetics and Genomics**, Shanghai, v. 12. n. 74, p. 1-12, 2016.

CONSORTIUM FOR THE BARCODE OF LIFE (CBOL) - Plant Working Group. A DNA barcode for land plants. **Proceedings of National Academy of Sciences**, Philadelphia, v.106, n.31, p.12794-12797, 2009.

COSTA, C. F.; COLLEVATTI, R. G.; CHAVES, L. J.; LIMA, J. S.; SOARES, T. N.; TELLES, M. P. C. Genetic diversity and fine-scale genetic structure in *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, Londres, p. 1–5, 2017.

COSTA, T. S.; SILVA, A. V. C.; LÊDO, A. S.; SANTOS, A. R. F.; SILVA JÚNIOR, J. F. Diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de mangaba em Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46. n. 5, p. 499-508, 2011.

DARRAULT, R. O.; SCHLINDWEIN, C. Limited fruit production in *Hancornia speciosa* (Apocynaceae) and pollination by nocturnal and diurnal insects. **Biotropica**, Zurich, v. 37, n. 3, p. 381–388, 2005.

DARRAULT, R. O.; SCHLINDWEIN, C. Polinização. In: SILVA JÚNIOR, J. F.; LÊDO, A. S. (Ed.). **A cultura da mangaba**. Aracajú: Embrapa, 2006. v. 01, cap. 03, p. 253.

FERREIRA, E. G.; MARINHO, S. J. O. Produção de frutos de Mangabeira para consumo *in natura* e industrialização. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 1. n. 1, p. 9-14, 2007.

FLORES, I. S.; SILVA, A. K.; FURQUIM, L. C.; CASTRO, C. F. S.; CHAVES, L. J.; COLLEVATTI, R. G.; LIÃO, L. M. HR-MAS NMR Allied to chemometric on *Hancornia speciosa* varieties differentiation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 708-714, 2018.

FREITAS, M. K. C.; COIMBRA, R. R.; AGUIAR, G. B.; AGUIAR, C. B. N.; CHAGAS, D. B. C.; FERREIRA, W. M.; OLIVEIRA, R. J. Variabilidade fenotípica e caracterização morfológica de uma população natural de *Hancornia speciosa* Gomes. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.28, n.5, p. 833-841, 2012

GANGA, R. M. D.; CHAVES, L. J.; NAVES, R. V. Parâmetros genéticos em progênies de *Hancornia speciosa* Gomes do Cerrado. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 84, p. 395–404, 2009.

GANGA, R. M. D.; FERREIRA, G. A.; CHAVES, L. J.; NAVES, R. V.; NASCIMENTO, J. L. Caracterização de frutos e árvores de Populações naturais de *Hancornia speciosa* Gomes do cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 1, p. 101-113, 2010.

GBIF Backbone Taxonomy. Checklist Dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2018-04-14.

GIACOMETTI, D.C. Recursos genéticos de fruteiras nativas do Brasil. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE RECURSOS GENÉTICOS DE FRUTEIRAS NATIVAS, 1992, Cruz das Almas, BA. **Anais...** Cruz das Almas, BA: EMBRAPA-CNPMPF, 1993, p. 13-27.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; de WAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, Londres, v. 270, p. 313-322, 2003.

HILU, K.W.; LIANG H. The *matK* gene: sequence variation and application in plant systematics. **American Journal of Botany**, Blacksburg, v. 84, n. 6, p. 830-839, 1997.

HOLLINGSWORTH, P. M.; GRAHAM, S. W.; LITTLE, D. P. Choosing and using a plant DNA barcode. **PlosOne**, São Francisco, v.6, p. 1-13, 2011.

JANZEN, D. H. How to conserve wild plants? Give the world the power to read them. In: KRUPNICK, G.; KRESS, J. **Plant Conservation: A Natural History Approach**, Chicago, p. 1-4, 2003.

KINOSHITA, L. S. Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo. **Instituto de Botânica**, São Paulo, v. 4, p. 35-92, 2005.

KRESS, W. J.; ERICKSON, D. L. DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 105, n. 8, p. 2761–2762, 2008.

KRESS, W. J. Plant DNA barcodes: Applications today and in the future. **Journal of Systematics and Evolution**, Beijing, v. 55, p. 291- 307, 2017.

KRESS, W. J.; WURDACK, K. J.; ZIMMER, E. A.; WEIGT, L. A.; JANZEN, D. H. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, n. 102, p. 8369–8374, 2005.

LAHAYE, R.; van der BANK, M.; BOGARIN, D.; WARNER, J.; PUPULIN, F.; GIGOT, G.; MAURIN, O.; DUTHOIT, S.; BARRACLOUGH, T. G.; SAVOLAINEN, V. DNA Barcoding the floras of biodiversity hotspots. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Philadelphia, v. 15. n. 8, p. 2923–2928, 2008.

LEDERMAN, I. E.; SILVA JÚNIOR, J. F. da; BEZERRA, J. E. F.; ESPÍNDOLA, A. C. M. **Mangaba** (*Hancornia speciosa* Gomes). Jaboticabal, 2000. 35 p. (Série Frutas Nativas).

LI, X. W.; YANG, Y.; HENTRY, R. J.; ROSSETTO, M.; WANG, Y.; CHEN, S. Plant DNA barcoding: from gene to genome. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, Cambridge, n. 90, p. 157–166, 2015.

MAIA, A. K. S. **Diversidade e estrutura genética de populações de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) nos Tabuleiros Costeiros do Nordeste do Brasil.** 2017. 57f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Melhoramento Genético de Plantas) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2017.

MONACHINO, J. A revision of *Hancornia* (Apocynaceae). **Lilloa**, Tucumán, v.11, p. 19-48, 1945.

MOURA, N. F.; CHAVES, L. J.; VENKOVSKY, R.; NAVES, R. V. N.; AGUIAR, A. V.; MOURA, M. F. Genetic structure of mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) populations in the cerrado region of central Brazil. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 27, n.3, p. 473-481, 2011.

NASCIMENTO, R. S. M.; CARDOSO, J. A.; COCOZZA, F. D. M. Caracterização física e físico-química de frutos de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) no oeste da Bahia. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 18. n. 8, p. 856-860, 2014.

NEWMASER, S. G.; FAZEKAS, A. J.; STEEVES, R. A. D.; JANOVEC, J. Testing candidate plant barcode regions in the Myristicaceae. **Molecular Ecology Resources**, Nottingham, n. 8, p. 480–490, 2008

NOGUEIRA, C. A.; STAFUZZA, N. B.; RIBEIRO, T. P.; PRADO, A. D. L.; MENESES, I. P. P.; PEIXOTO, N.; GONGALVES, P. J.; ALMEIDA, L. M. Intraspecific differentiation of *Hancornia speciosa* revealed by simple sequence repeat and random amplified polymorphic DNA marker. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 14. n. 4, p. 15996-16005, 2015.

PALMER, J. D. Chloroplast DNA and Molecular Phylogeny. **BioEssays**, Michigan, v. 2. n. 6, p. 262-267, 1985.

PEREIRA, A. V.; PEREIRA, E. B. C.; JÚNIOR, J. F. D. S.; SILVA, D. B. D. Mangaba. In: VIEIRA, R. F.; COSTA, T. S. A.; SILVA, D. B.; FERREIRA, F. R.; SANO, S. M. (Ed.). **Frutas Nativas da Região Centro-Oeste do Brasil**. 1ª ed. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. v. 1, cap. 12, p. 188-215.

RIZZO, J. A.; FERREIRA, H. D. *Hancornia speciosa* no estado de Goiás. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 36. 1985, Curitiba, PR. **Anais...** Brasília: Sociedade Botânica do Brasil, 1990. v. 1, p. 363-368.

SEBERG, O.; HUMPHRIES, C. J.; KNAPP, S.; STEVENSON, D. W.; PERTERSEN, G.; SCHARFF, N.; ANDERSEN, N. M. . Shortcuts in systematics? A comentary on DNA-based taxonomy. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdã, v. 18, p. 63-65, 2003.

SHINOZAKI, K.; OHME, M.; TANAKA, M.; WAKASUGI, T.; HAYASHIDA, N.; MATSUBAYASHI, T.; ZAITA, N.; CHUNWONGSE, J.; OBOKATA, J.; YAMAGUCHI-

SHINOZAKI, K.; OHTO, C.; TORAZAWA, K.; MENG, BY.; SUGITA, M.; DENO, H.; KAMOGASHIRA, T.; YAMADA, K.; KUSUDA, J.; TAKAIWA, F.; KATO, A.; TOHDOH, N.; SHIMADA, H.; SUGIURA, M. The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. **The Embo Journal**, Nagoya, v. 5, n. 9, p. 2043-2049, 1986.

SILVA JUNIOR, J. F. Recursos genéticos da mangabeira nos Tabuleiros Costeiros e Baixada Litorânea do Nordeste do Brasil. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGABA, 1., 2003, Aracaju, SE. **Anais...** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2003. CD-ROM.

SILVA JÚNIOR, J. F.; LÊDO A. S. **A cultura da mangaba**. Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, 2006. 253 p.

SILVA, A. V. C.; RABBANI, A. R. C.; SENA FILHO, J. G.; ALMEIDA, C. S.; FEITOSA, R. B. Genetic diversity analysis of mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes), an exotic brazilian tropical species. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, Yucatán, v. 15, p. 217-225, 2012.

SILVA, A. V. C.; SANTOS, A. R. F.; WICKERT, E.; SILVA JÚNIOR, J. F.; COSTA, T. S. Divergência genética entre acessos de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 6. n. 4, p. 572-578, 2011.

SILVA, D. B. da; SILVA, J. A. da; JUNQUEIRA, N. T. V.; ANDRADE, L. R. M. **Frutas do cerrado**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. 179 p.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; OLIVEIRA, L. M.; SILVA, D. R. G.; PAIVA, P. D. O. Cultura da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Boletim Agropecuário**, Lavras, v. 67, p. 1-12, 2004.

SOUSA, C. D. S.; SILVA, S. A.; COSTA, M. A. P. D. C.; LOYOLA, D. A. C. V.; FONSECA, A. A.; COSTA, C. A. L. D. C.; ALMEIDA, W. A. B. D.; PEIXOTO, C. P. Mangaba: perspectivas e potencialidades. **Bahia Agrícola**, Salvador, v. 7, n. 1, p. 29-31, 2005.

STACE, C. A. Plant taxonomy and byosistematics – does DNA provide all the answers? **Taxon**, Viena, v. 54, p. 999-1007, 2005.

STOECKLE, M.Y.; GAMBLE, C.C.; KIRPEKAR, R.; YOUNG, G.; AHMED, S.; LITTLE, D.P. Commercial teas highlight plant DNA barcoding successes and challenges. **Scientific Reports**, Londres, v. 1, n. 42, p. 7, 2011.

ŠTORCHOVÁ, H.; OLSON, M. S. The architecture of the chloroplast *trnH-psbA* noncoding region in angiosperms. **Plant Systematics and Evolution**, Viena, v. 268, p. 235– 256, 2007.

SANTANA, J. T. S. Análise molecular em variedades botânicas de *Hancornia speciosa* ...

TAUTZ, D.; ARCTANDER, P.; MINELLI, A.; THOMAS, R. H.; VOGLER, A. P. A plea for DNA taxonomy. **Trends in Ecology and Evolution**, Londres, v. 18, p. 70-74, 2003.

YOKOMIZO, G. K. **A mangabeira e os principais aspectos do seu melhoramento genético na Embrapa Amapá**. Macapá: EMBRAPA AP, 2015. 30 p. (EMBRAPA-AP. Documentos, 91).

ZURAWSKI, G.; PERROT, B.; BOTTOMLEY, W.; WHITEFIELD, P.R. The structure of the gene for the large subunit of ribulose-1,5 -bisphosphate carboxylase from spinach chloroplast DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 9, n.14, p. 3251–3270, 1981.

CAPÍTULO II

ANÁLISE MOLECULAR EM VARIEDADES BOTÂNICAS DE *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae)

Manuscrito a ser submetido para publicação na revista **Crop Breeding and Applied Biotechnology**.

1 **Análise molecular em variedades botânicas de *Hancornia speciosa* (Apocynaceae)**

2 **Resumo**

3 São descritas seis variedades botânicas de *Hancornia speciosa* Gomes, no entanto, há
4 dificuldade em distingui-las o que sugere que constituam variações devido a adaptações
5 ecológicas. A fim de solucionar problemas de classificação taxonômica, objetivou-se estudar
6 a filogenia usando sequências de DNA plastidial. Folhas foram coletadas em oito Estados
7 brasileiros, o DNA foi extraído e regiões plastidiais foram amplificadas e devidamente
8 analisadas. Foram observados onze haplótipos distribuídos em biomas do Brasil. Dois grupos
9 genéticos distintos foram observados: um contendo *gardneri*, *pubescens* e *cuyabensis*,
10 distribuídas no Cerrado e o outro contendo *speciosa*, encontrada na Caatinga e Mata
11 Atlântica, o que reflete ser consequência de isolamento por distância. A relação filogenética
12 entre as variedades oriundas do Cerrado revela que *gardneri* é um híbrido entre *pubescens* e
13 *cuyabensis*. Os resultados evidenciam a inexistência de *maximiliani* e *lundii*. Conclui-se que
14 somente três variedades botânicas (*speciosa*, *pubescens* e *cuyabensis*) devem ser consideradas
15 para a espécie.

16 **Palavras-chave:** Mangabeira, cpDNA, DNA barcoding, Taxonomia.

17 **Introdução**

18 *Hancornia speciosa* Gomes (mangabeira) é uma espécie frutífera nativa do Brasil com
19 elevado potencial no cenário de fruticultura tropical por produzir uma das mais importantes
20 matérias-primas para a agroindústria de polpas, sucos e sorvetes (Silva Júnior e Lêdo 2006).
21 Caracteriza-se por possuir ampla distribuição geográfica e por ser a única espécie constituinte
22 do gênero *Hancornia* (Apocynaceae) na qual são descritas seis variedades botânicas de
23 acordo com diferenças principalmente na folha e flor: *H. speciosa* var. *speciosa* Gomes; *H.*
24 *speciosa* var. *maximiliani* A. DC., *H. speciosa* var. *cuyabensis* Malme, *H. speciosa* var. *lundii*
25 A. DC., *H. speciosa* var. *gardneri* (A. DC.) Muell. Arg. e *H. speciosa* var. *pubescens* (Nees.
26 et Martius) Muell. Arg. (Monachino 1945).

27 De maneira geral, a variedade *speciosa*, cuja ocorrência é generalizada na Caatinga e
28 Mata Atlântica, apresenta diferenciação morfológica singular em relação às demais
29 permitindo que seja facilmente reconhecida a campo, possuindo folhas pequenas, pecíolo
30 longo e fruto de coloração amarela com manchas avermelhadas com um formato oblongo.
31 Diferentemente das variedades *pubescens* e *gardneri* que ocorrem no Cerrado, possuem
32 folhas grandes e pecíolos curtos predominando frutos de coloração verde claro com formato
33 redondo, sendo a presença de pubescência nas folhas da variedade *pubescens* a única
34 diferença entre estas. A variedade *cuyabensis* também ocorre no Cerrado, tem folhas médias,
35 pecíolo curto e frutos de coloração verde acentuado com formato oblongo. Já *maximiliani* e
36 *lundii* possuem, respectivamente, folhas pequenas com pecíolo longo e folhas médias com
37 pecíolo curto e ambas têm relatos de ocorrência no Cerrado. A variedade *lundii* também foi
38 relatada nos biomas Caatinga e Mata Atlântica (Monachino 1945, Ganga et al. 2010).

39 A identificação destas variedades tem sido feita somente por meio de caracteres
40 morfológicos, prática considerada complexa e passível a erros devido à ocorrência de
41 variedades simpátricas, à alta variação entre populações e indivíduos com fenótipo
42 intermediário (Collevatti et al. 2016, Flores et al. 2018), sugerindo a hipótese de não haver
43 diferentes variedades e sim variações devido a adaptações ecológicas.

44 O conhecimento acerca das variedades botânicas de mangabeira é de extrema
45 importância, pois pode fornecer informações visando explorar adequadamente a variabilidade
46 genética disponível em programas de melhoramento, além de corroborar com informações
47 capazes de promover adequado manejo e conservação da espécie. Trabalhos visando à

48 caracterização morfológica (Ganga et al. 2010, Freitas et al. 2012, Nascimento et al. 2014) e
49 molecular, por meio de marcadores de DNA (Moura et al. 2011, Silva et al. 2011, Costa et al.
50 2011, Silva et al. 2012, Amorim et al. 2015, Collevatti et al. 2016, Costa et al. 2017) trazem
51 informações relevantes acerca da variabilidade e diversidade genética existente em
52 mangabeira, porém, ainda são insuficientes para elucidar, de fato, a existência das diferentes
53 variedades botânicas descritas. Dessa maneira, torna-se imprescindível o conhecimento
54 mediante as relações evolutivas nas variedades descritas. Sendo assim, objetivou-se estudar a
55 filogenia molecular em variedades de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae).

56 **Material e métodos**

57 *Material biológico e extração de DNA*

58 A coleta do material biológico consistiu de amostras oriundas de populações naturais
59 em oito Estados brasileiros: Goiás, Minas Gerais, Bahia, Ceará, Pernambuco, Paraíba, Sergipe
60 e Maranhão, abrangendo os Biomas Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica, onde pelo menos 20
61 indivíduos foram amostrados em cada população e nove acessos de três variedades da
62 Coleção de Germoplasma da Universidade Federal de Goiás, sendo dois acessos de *pubescens*
63 oriundos do Estado de Goiás, um do Mato Grosso do Sul, dois acessos de *gardneri* oriundos
64 do Mato Grosso do Sul e um de Goiás e três acessos de *cuyabensis* oriundos do Mato Grosso.
65 Ressalta-se que a classificação botânica para os referidos acessos é equivalente às descrições
66 morfológicas demonstradas na literatura e foram utilizados para dar subsídio às conclusões
67 deste estudo.

68 Nas populações naturais a amostragem foi realizada priorizando árvores adultas e sem
69 sinal de injúria, obedecendo a um distanciamento mínimo de 100 metros entre elas. As
70 coordenadas geográficas foram obtidas por meio de Receptor Global Position System (GPS).

71 As amostras consistiram de folhas jovens que foram acondicionadas em sacos
72 plásticos com as identificações correspondentes e mantidas em caixa de isopor com gelo até
73 serem transportadas para o Laboratório de Recursos Genéticos da Universidade Federal de
74 Alagoas, *Campus* de Arapiraca, onde foram devidamente armazenadas em freezer a -20°C até
75 o momento da extração de DNA. O protocolo utilizado para a extração foi Doyle e Doyle
76 (1990) com algumas modificações e a integridade do DNA foi aferida em gel de agarose a
77 1%.

79 *Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Sequenciamento*

80 Três regiões do *cpDNA* foram amplificadas usando *primers* descritos por Scarcelli et
81 al. (2011), correspondendo aos genes *matK* e *rbcL* e ao espaçador intergênico *trnH-psbA*. As
82 reações de PCR foram conduzidas em um volume de 50 µL contendo: 1 µL do DNA
83 genômico, 5 µL de tampão PCR 10X (contendo 20mM MgCl₂); 5µL de dNTP 1 mM; 0,4 µL
84 de TaqDNA Polimerase (5 U); 1 µL de cada *primer* 1 mM e 36,6 µL de água ultrapura. As
85 ampliações foram conduzidas em um termociclador (*AppliedBiosystems*) programado com
86 uma temperatura de desnaturação inicial de 3 minutos a 94° C, 35 ciclos de 30 segundos a
87 94°C; 1 minuto a 48° C; 1 minuto a 72°C e um ciclo final de 10 minutos a 72°C. Os produtos
88 de PCR foram verificados em gel de agarose a 1% para verificar a amplificação e,
89 posteriormente, foram sequenciados usando o kit de sequenciamento BigDye®
90 (*AppliedBiosystems*) de acordo com as recomendações do fabricante seguida de eletroforese
91 capilar realizada no analisador genético ABI 3500 (*AppliedBiosystems*).

92 *Análise de dados*

93 As sequências foram alinhadas usando o software MAFFT (Kato e Standley 2013) e a
94 filogenia foi reconstruída com o método bayesiano, usando o modelo de substituição GTR+I+G (Nei
95 e Kumar 2000) e suporte dos ramos foi acessado com posterior probabilidade. O modelo
96 GTR+I+G foi determinado usando “Bayesian Information Criterion Evolutionary” no
97 software MEGA7 (Kumar et al. 2016) e a análise bayesiana foi conduzida usando Beast
98 v1.8.0 (Drummond e Rambaut, 2007). Uma rede de haplótipos foi determinada usando o
99 pacote “*haplotypes*”, implementado no R por meio do método estatístico parcimônia
100 (Templeton et al. 1992). A análise de componentes principais foi conduzida usando o pacote
101 “*adegenet*” e os componentes principais representados graficamente pelos pacotes “*plot3D*” e
102 “*rgl*” implementados no software R.

103 **Resultados e discussão**

104

105 As regiões plastidiais *trnH-psbA*, *rbcL* e *matK* não apresentarem problemas quanto à
106 amplificação e sequenciamento, entretanto, os genes *rbcL* e *matK* mostraram que não são
107 adequados como DNA barcoding em *H. speciosa* devido ao seu baixo poder discriminatório,
108 apresentando um único haplótipo em todos os acessos analisados. A explicação para este
109 resultado é que a eficiência de identificação através desta técnica é variável de acordo com o

110 grupo de plantas, por isso os três marcadores (*trnH-psbA*, *rbcL* e *matK*) podem mostrar
111 variações na determinação de perfis genéticos (Hollingsworth et al. 2009, Zhang et al. 2012).

112 Em contrapartida, o espaçador intergênico *trnH-psbA* detectou polimorfismo nas
113 sequências analisadas, mostrando-se eficiente para comprovar pela primeira vez a existência
114 de diferentes variedades botânicas em *H. speciosa*. Para esta região foram sequenciados 427
115 bp em 151 indivíduos, correspondendo a 11 haplótipos, distribuídos em diferentes biomas do
116 Brasil.

117 A análise dos haplótipos mostrou distinta separação entre a variedade *speciosa* e as
118 demais variedades, em que o componente principal 1 (correspondendo a 59%) discriminou o
119 grupo da variedade *speciosa* do grupo com as demais (Figura 1A). Por outro lado, *pubescens*,
120 *gardneri* e *cuyabensis* possuem maior aproximação genética. Resultados semelhantes foram
121 alcançados por Flores et al. (2018), através de análises quimiométricas aplicadas em dados de
122 ressonância magnética nuclear (1 H HR-MAS NMR) com o intuito de diferenciar variedades
123 de *H. speciosa*, onde concluem que a variedade *speciosa* é distinta das demais por exibir
124 maior diferenciação química em relação a *pubescens*, *gardneri* e *cuyabensis*.

125 A diversidade de nucleotídeos oriunda do espaçador intergênico *trnH-psbA* revelou 11
126 haplótipos: H4, H5, H6, H7, H10 e H11 exclusivos de *speciosa*; H1 de *pubescens*; H2, H3 e
127 H9 de *gardneri* e H8 de *cuyabensis* (Figura 1B). A análise filogenética mostrou dois clados
128 monofiléticos: um contendo *pubescens*, *gardneri* e *cuyabensis* e o outro com a variedade
129 *speciosa*, fato este que coincide com seus aspectos morfológicos peculiares em relação às
130 demais: possui pecíolo de 9 a 15 mm de comprimento e folhas com cerca de 6 cm de
131 comprimento e 2 cm de largura (Monachino 1945), além de frutos amarelos e oblongos
132 (Ganga et al. 2010). Este resultado provavelmente é consequência do isolamento por distância
133 já que a variedade *speciosa* ocorre somente na Caatinga e Mata Atlântica (Chaves 2006). Vale
134 a pena destacar que é a única variedade que apresenta época distinta de florescimento
135 (Collevatti et al. 2016).

136 A variedade *cuyabensis* caracteriza-se por possuir pecíolo com cerca de 3 mm de
137 comprimento; folhas de 4 a 10 cm de comprimento e 1,5 a 3,0 cm de largura (Monachino
138 1945) e frutos de coloração verde acentuado com formato oblongo (Ganga et al. 2010).
139 Morfologicamente, somente a presença de pubescência nas folhas da variedade *pubescens*
140 permite diferenciá-la de *gardneri*, pois ambas possuem pecíolo curto, folhas variando de 6 a

141 12 cm de comprimento e 3 a 6 cm de largura (Monachino 1945) e frutos de coloração verde
142 claro com formato redondo (Ganga et al. 2010).

143 Em regiões limítrofes de ocorrência de mangabeira no Cerrado, é possível observar
144 plantas com características intermediárias indicando uma possível hibridação entre as
145 variedades encontradas neste bioma (Chaves 2006). O fato de não haver restrição ao fluxo
146 gênico entre as variedades (Collevatti et al. 2016), atrelado ao agrupamento dos haplótipos de
147 *gardneri* na árvore filogenética permitem afirmar que na verdade *gardneri* deve ser um
148 híbrido entre as variedades *pubescens* e *cuyabensis*, onde fica evidente que os dois subgrupos
149 deste clado são formados por pelo menos 1 haplótipo de *gardneri* enaltecendo a relação
150 próxima com os haplótipos dos prováveis parentais. Para Chaves (2006) a presença/ausência
151 de tricomas no limbo foliar é unicamente uma característica qualitativa não havendo,
152 portanto, a necessidade de considerar diferentes variedades, mas sim um caráter monogênico.

153 As descrições morfológicas para a variedade *maximiliani* apontam que ela possui
154 pecíolo com cerca de 8 mm de comprimento, folhas de 5 a 6 cm de comprimento e 2,0 a 2,5
155 cm de largura. Já *lundii* possui pecíolo com 3 a 5 mm de comprimento, folhas com 5 a 7 cm
156 de comprimento e 3 cm de largura (Monachino 1945). Apesar da Coleção de Germoplasma
157 não possuir acessos para as variedades acima mencionadas, era esperada a formação de
158 haplótipos distintos nas análises realizadas em populações naturais, indicando pertencer a elas
159 já que Este estudo consistiu de uma amostragem abrangente com um adequado número de
160 indivíduos analisados, porém isso não aconteceu, sugerindo a possibilidade de desconsiderar a
161 existência de ambas, indicando que as descrições fenotípicas sejam resultantes de variações
162 devido a adaptações ecológicas, o que não permite caracterizá-las como variedades.

163 A distribuição dos haplótipos mostrou que a variedade *speciosa*, de ocorrência na
164 Caatinga e Mata Atlântica, possui seis haplótipos, enquanto *pubescens* e *cuyabensis* somente
165 um haplótipo e *gardneri* apresentou três haplótipos (Figura 2A). Curiosamente, a variedade
166 *cuyabensis* está distribuída em Minas Gerais, Bahia e no Ceará. Provavelmente a variedade
167 *cuyabensis* foi inserida no Ceará mediante ação antrópica. Entre os haplótipos, o H5 exclusivo
168 da variedade *speciosa* é o mais abundante e apresenta distribuição somente no litoral do
169 Nordeste do Brasil, enquanto os haplótipos encontrados no Maranhão são distintos dos
170 detectados no litoral, mostrando uma estruturação de populações (Figura 2A). A rede de
171 haplótipos mostrou que os haplótipos da variedade *speciosa* possuem quatro SNPs. Por outro

172 lado, os haplótipos de *pubescens*, *gardneri* e *cuyabensis* possuem somente um SNP (Figura
173 2B).

174 Pesquisas demonstram que entre populações de mangabeira há variação no tamanho,
175 cor e produção de frutos (Ganga et al. 2010, Freitas et al. 2012, Nascimento et al. 2014).
176 Segundo Ganga et al. (2010), *gardneri* e *pubescens* destacam-se como de maior potencial
177 para a seleção baseada em caracteres de tamanho e massa dos frutos. Todavia, é
178 extremamente importante a realização de mais pesquisas com a mangabeira para promover
179 seu cultivo já que o extrativismo representa quase a totalidade da produção nacional.

180 **Conclusões**

181

182 Os estudos comprovaram que *Hancornia speciosa* Gomes possui três variedades: as
183 variedades *pubescens* e *cuyabensis* que apresentam baixo grau de diferenciação entre si e a
184 variedade *speciosa*, que apresenta maior grau de diferenciação em relação às demais. As duas
185 primeiras são predominantes no Bioma Cerrado e a última amplamente distribuída na
186 Caatinga e nos Tabuleiros Costeiros e restingas da Mata Atlântica.

187 **Agradecimentos**

188 Agradecemos ao Laboratório de Recursos Genéticos da Universidade Federal de
189 Alagoas, *Campus* de Arapiraca, pelo suporte científico, ao Programa de Genética e
190 Melhoramento de Plantas da Universidade Federal de Goiás pelo acesso à Coleção de
191 Germoplasma de Mangabeira e ao CNPq pelo financiamento desta pesquisa por meio do
192 projeto de processo no 484847/2013-9.

193

194

195

196

197

198

Referências

Amorim JAE, Mata LR, Lêdo AS, Azevedo VCR and Silva AVC (2015) Diversity and genetic structure of mangaba remnants in states of northeastern Brazil. **Genetics and Molecular Research**14: 823-833.

Chaves LJ (2006) Recursos Genéticos no Cerrado. In: Silva Junior JF and Lêdo AS (eds.). **A cultura da mangaba**. Aracajú: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 157-163 p.

Collevatti RG, Olivati AM, Telles MPC and Chaves LJ (2016) Gene flow among *Hancornia speciosa* (Apocynaceae) varieties and hybrid fitness. **Tree Genetics and Genomics**12: 1-12.

Costa CF, Collevatti RG, Chaves LJ, Lima JS, Soares TN and Telles MPC (2017) Genetic diversity and fine-scale genetic structure in *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**1: 1-5.

Costa TS, Silva AVC, Lêdo AS, Santos ARF and Silva Júnior JF (2011) Diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de mangaba em Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 46: 499-508.

Doyle JJ and Doyle JL (1990) A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. **Focus** 12: 13-15

Drummond AJ and Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **BMC Evolutionary Biology**.7: 1-8.

Flores IS, Silva SK, Furquin LC, Castro CFS, Chaves LJ, Collevatti RG and Lião LM (2018) HR-MAS NMR Allied to Chemometric on *Hancornia speciosa* varieties differentiation. **Journal of the Brazilian Chemical Society** 1: 1-7.

Freitas MKC, Coimbra RR, Aguiar GB, Aguiar CBN, Chagas DBC, Ferreira WM and Oliveira RJ (2012) Variabilidade fenotípica e caracterização morfológica de uma população natural de *Hancornia speciosa* Gomes. **Bioscience Journal** 28: 833-841.

Ganga RMD, Ferreira GA, Chaves LJ, Naves RV and Nascimento JL (2010) Caracterização de frutos e árvores de Populações naturais de *Hancornia speciosa* Gomes do cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura** 32: 101-113.

Hollingsworth ML, Andra Clark A, Forrest LL, Richardson J, Pennington RT, Long DG, Cowan R, Chase MW, Gaudeul M and Hollingsworth PM (2009) Selecting barcoding loci for plants: evaluation of seven candidate loci with species – level sampling in three divergent groups of land plants. **Molecular Ecology Research** 9: 439-457.

Katoh K and Standley DM. (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution** 30: 772–780

Kumar S, Stecher G and Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution** 33: 1870-1874.

SANTANA, J. T. S. Análise molecular em variedades botânicas de *Hancornia speciosa* ...

Monachino JA (1945) Revision of *Hancornia* (Apocynaceae). **Lilloa** **11**: 19-48.

Moura NF, Chaves LJ, Venkovsky R, Naves RVN, Aguiar AV and Moura MF (2011) Genetic structure of mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) populations in the cerrado region of central Brazil. **Bioscience Journal** **27**: 473-481.

Nascimento RSM, Cardoso JA and Coccozza FDM (2014) Caracterização física e físico-química de frutos de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) no oeste da Bahia. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** **18**: 856-860.

Nei M and Kumar S (2000) **Molecular evolution and phylogenetics**. Oxford University Press, Oxford, 333p.

Nogueira CA, Stafuzza NB, Ribeiro TP, Prado ADL, Meneses IPP, Peixoto N, Gongalves PJ and Almeida LM (2015) Intraspecific differentiation of *Hancornia speciosa* revealed by simple sequence repeat and random amplified polymorphic DNA marker. **Genetics and Molecular Research** **14**: 15996-16005.

Scarcelli N, Barnaud A, Eiserhardt W, Treier UA, Seveno M, D'Anfray A, Vigouroux Y, Pintaud J-C (2011) Set of 100 chloroplast DNA primer pairs to study population genetics and phylogeny in monocotyledons. **Plos One** **6**: e19954.

Silva AVC, Rabbani ARC, Sena Filho JG, Almeida CS and Feitosa RB (2012) Genetic diversity analysis of mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes), an exotic brazilian tropical species. **Tropical and Subtropical Agroecosystems** **15**: 217-225.

Silva AVC, Santos ARF, Wickert E, Silva Júnior JF and Costa TS (2011) Divergência genética entre acessos de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias** **6**: 572-578.

Silva Júnior JF and Lêdo AS (2006) **A cultura da mangaba**. Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, 253p.

Templeton AR, Crandall KA, Sing CF (1992) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. **Genetics** **132**: 619-633.

Zhang CY, Wang FY, Yan HF, Hao G, Hu CM and Ge XJ (2012) Testing DNA barcoding in closely related groups of *Lysimachia* L. (Myrsinaceae). **Molecular Ecology Research** **12**: 98-108.

Anexos

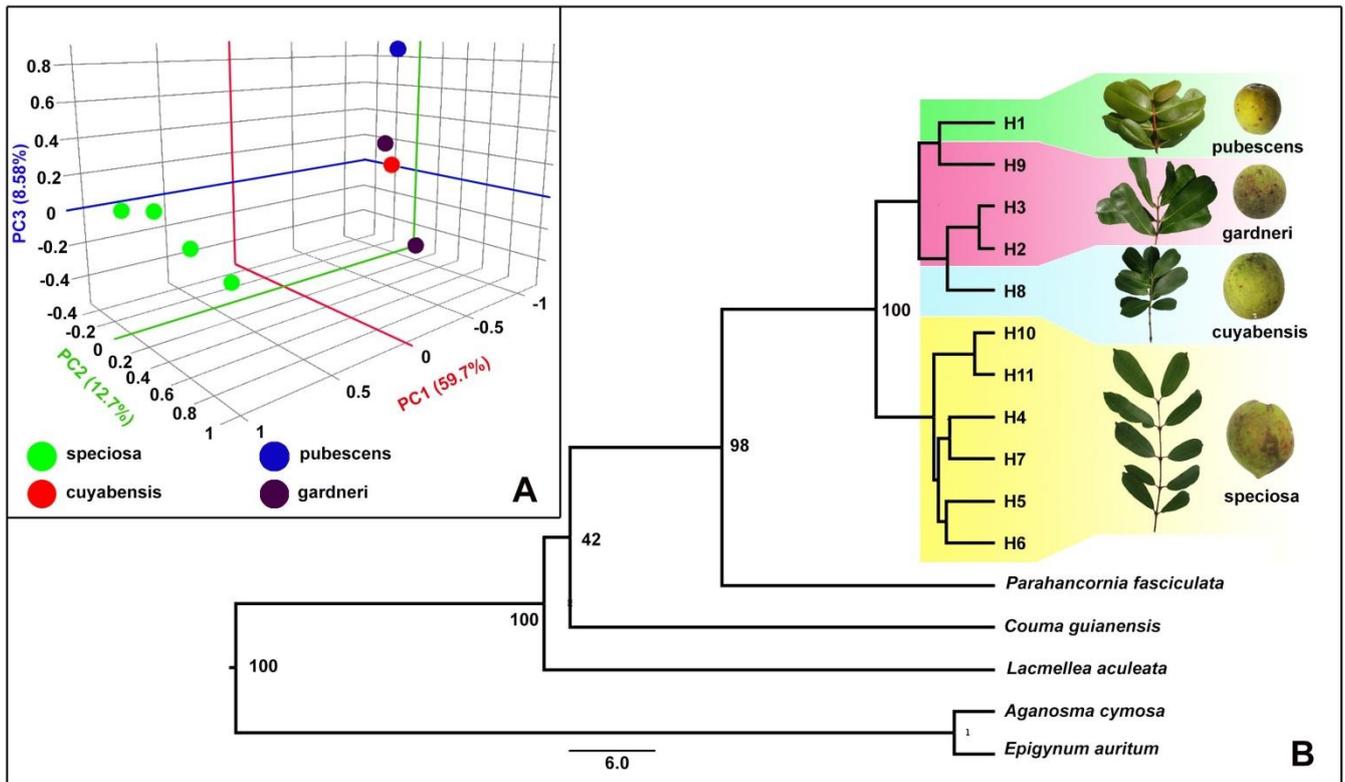


Figura 1. A: Análise de Componentes Principais (CPA) em diferentes variedades botânicas de *Hancornia speciosa* Gomes (mangabeira). **B:** Árvore filogenética de *H. speciosa* baseada em dados do espaçador intergênico *trnH-psbA*. Suporte representado por posterior probabilidade ou porcentagem.

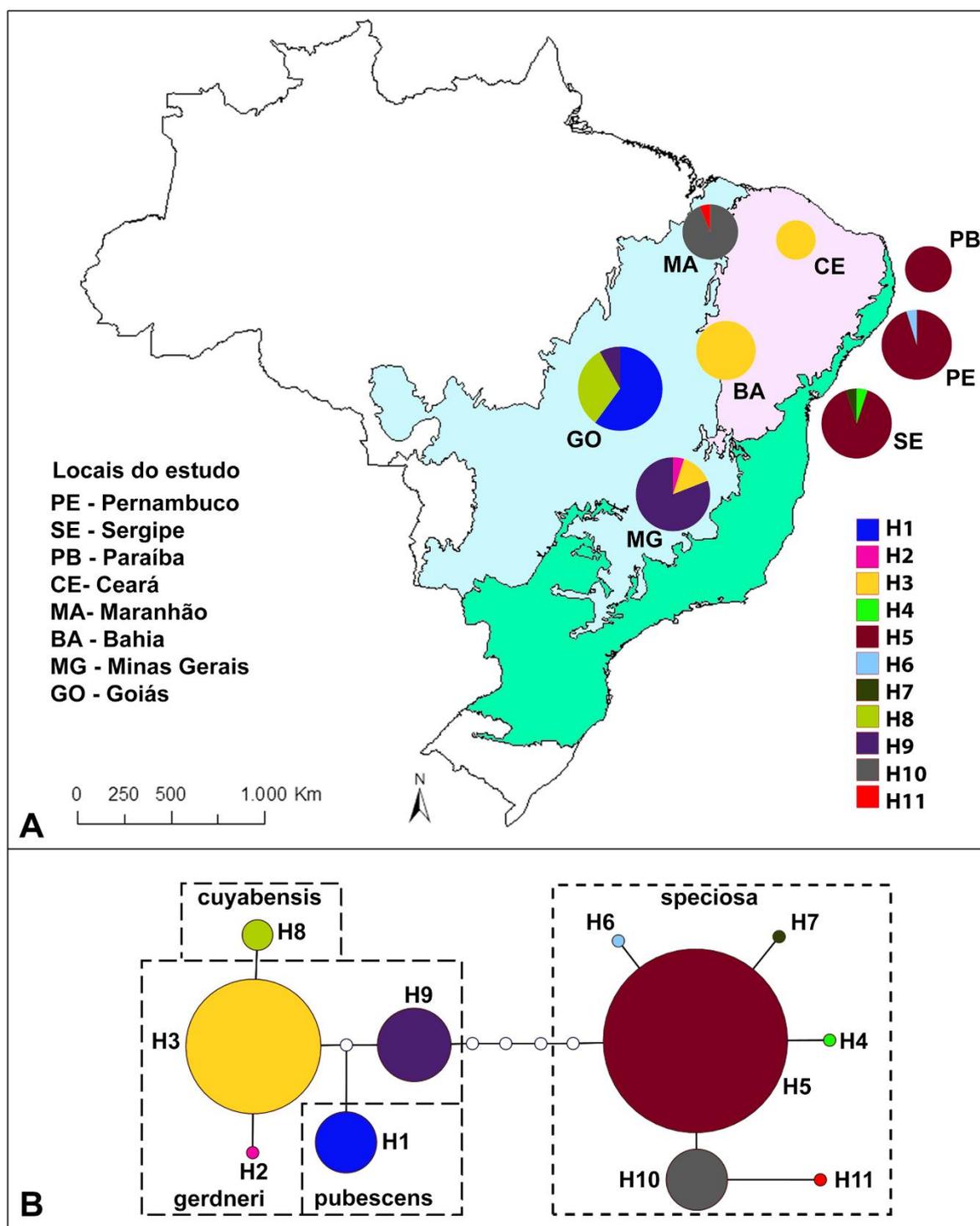


Figura 2. A: Distribuição dos haplótipos nos indivíduos estudados em populações naturais. As cores representam os biomas brasileiros de ocorrência de mangabeira; verde – Mata Atlântica, bege – Caatinga e azul claro – Cerrado. Os gráficos pizza representam as frequências dos haplótipos, conforme legenda contida da figura. O tamanho dos gráficos pizza representa o tamanho da amostra em cada local. **B:** Rede de haplótipos (pertencente aos acessos da Coleção e aos indivíduos oriundos de populações naturais) obtida por estatística parcimônia representando os haplótipos pelas cores da legenda da figura A. Os tamanhos dos círculos representam a frequência.

	-39,4961 W	-35,0196W	-35,1159W	-36.859722W	-41,5566W	-42,9480W	-44,2503 W	-48,3852 W
9	-7,3561 S	-8,5226S	-6,6713S	-10.738056S	-12,4533 S	-2,8830S	-16,8566 S	-14,3830 S
	-39,4950 W	-35,0186W	-35,1320W	-36.868611W	-41,5078 W	-42,9497W	-44,2538 W	-48,2833 W
10	-7,3747 S	-8,5232S	-6,6713S	-10.733889S	-12,4525 S	-2,8833S	-16,8532 S	-14,4747 S
	-39,4950 W	-35,0184W	-35,1327W	-36.877500W	-41,5068 W	-42,9476W	-44,2458 W	-48,3419 W
11	-7,3716 S	-8,5239S	-6,6707S	-10.741944S	-12,4543 S	-2,8818S	-16,2553 S	-14,4058 S
	-39,4722 W	-35,0176W	-35,1330W	-36.877222W	-41,5157W	-42,9447W	-44,2515 W	-48,3533 W
12	-7,3844 S	-8,5244S	-6,6701S	-10.741667S	-12,4557 S	-2,8829S	-16,2464 S	-14,4522 S
	-39,4711 W	-35,0177W	-35,1160W	-36.888611W	-41,5163 W	-42,9497W	-44,1778 W	-48,2983 W
13	-7,4258 S	-8,5254S	-6,6702S	-10.734167S	-12,4589 S	-2,8832S	-16,2497 S	-14,6797S
	-39,4705W	-35,0173W	-35,1146W	-36.899722W	-41,5174 W	-42,9493W	-44,2450 W	-48,4405 W
14	-	-8,5247S	-6,6694S	-10.736667S	-12,4471 S	-2,8806S	-16,2490 S	-16,1236 S
	-	-35,0171W	-35,1146W	-36.763611W	-41,5211 W	-42,9519W	-44,2467 W	-50,2966 W
15	-	-	-6,6908S	-10.725556S	-12,4470 S	-2,8808S	-16,2483 S	-16,0866 S
	-	-	-35,1160W	-36.766944W	-41,5225 W	-42,9534W	-44,2486 W	-50,3119 W
16	-	-	-6,6898S	-10.725833S	-12,4384 S	-2,8819S	-15,3941S	-16,1063 S
	-	-	-35,1163W	-36.752778W	-41,5123 W	-42,9479W	-42,7573 W	-50,1963 W
17	-	-	-6,6887S	-10.714167S	-12,4320 S	-	-15,3974 S	-16,1008 S
	-	-	-35,1160W	-36.742222W	-41,4915 W	-	-42,7554 W	-50,2216 W
18	-	-	-6,6887S	-10.642222S	-12,4311 S	-	-15,3824 S	-16,1730 S

	-	-	-35,1175W	36.878889"W	-41,4882 W	-	-42,7587 W	-50,2866 W
19	-	-	-6,6909S	-10.652500S	-12,4299 S	-	-15,3734 S	-14,2247 S
	-	-	-35,1174W	-36.873333W	-41,4850 W	-	-42,7590 W	-47,9986 W
20	-	-	-6,6925S	-10.665833S	-12,4274 S	-	-15,3682 S	-14,4797 S
	-	-	-35,1168W	-36.869444W	-41,4840 W	-	-42,7583 W	-48,1788 W
21	-	-	-6,7038S	-	-	-	-	-14,3755 S
	-	-	-35,1185W	-	-	-	-	-48,2897 W

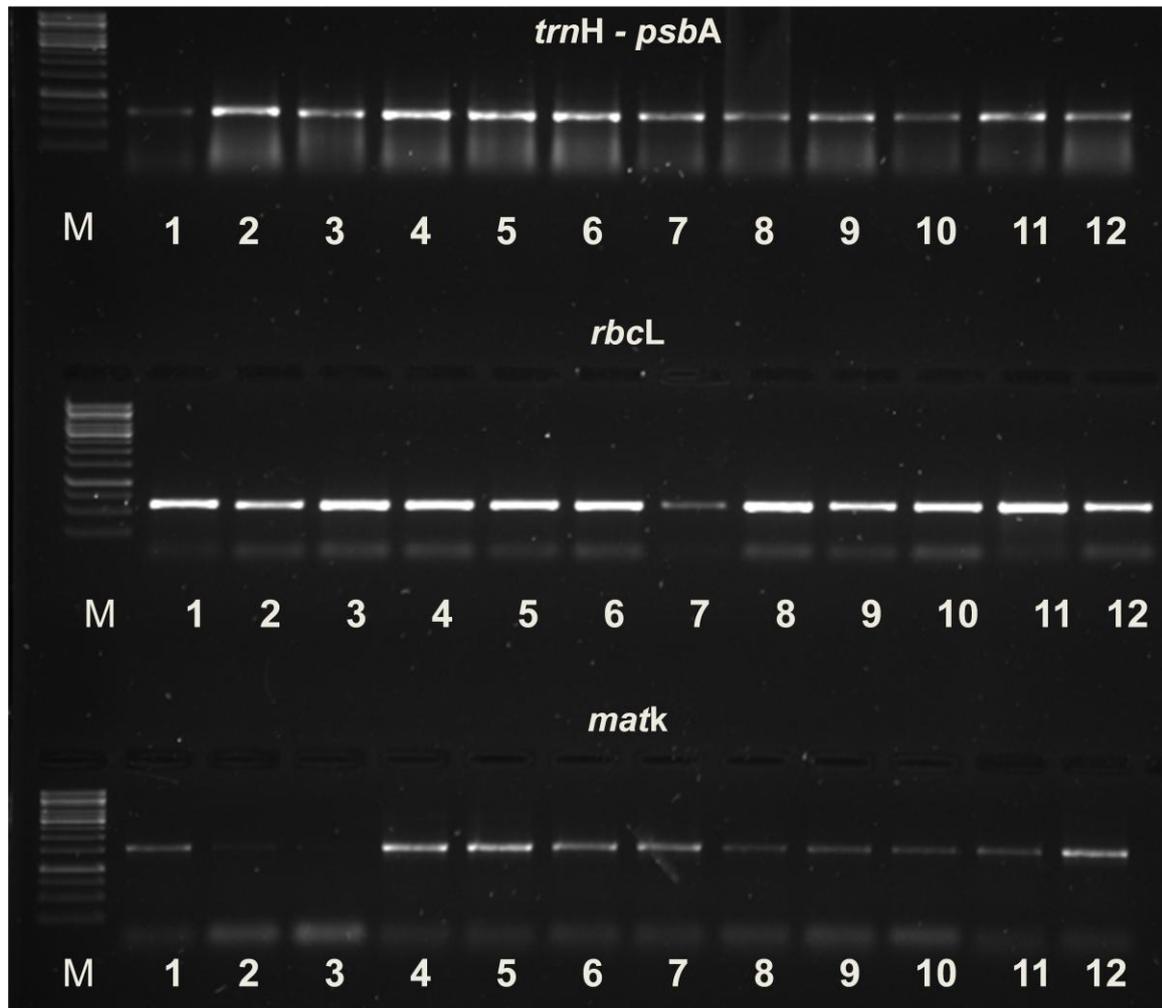


Figura 4: Padrão eletroforético em gel de agarose (1%) das PCRs obtidas para *Hancornia speciosa* em diferentes regiões do cpDNA (*trnH - psbA*, *rbcL* e *matK*). M: Peso Molecular 1kb. **FONTE:** TERTO, J.

S/N G:210 A:781 T:839 C:621
 KB.bcp
 KB 1.4.1.8 Cap:2

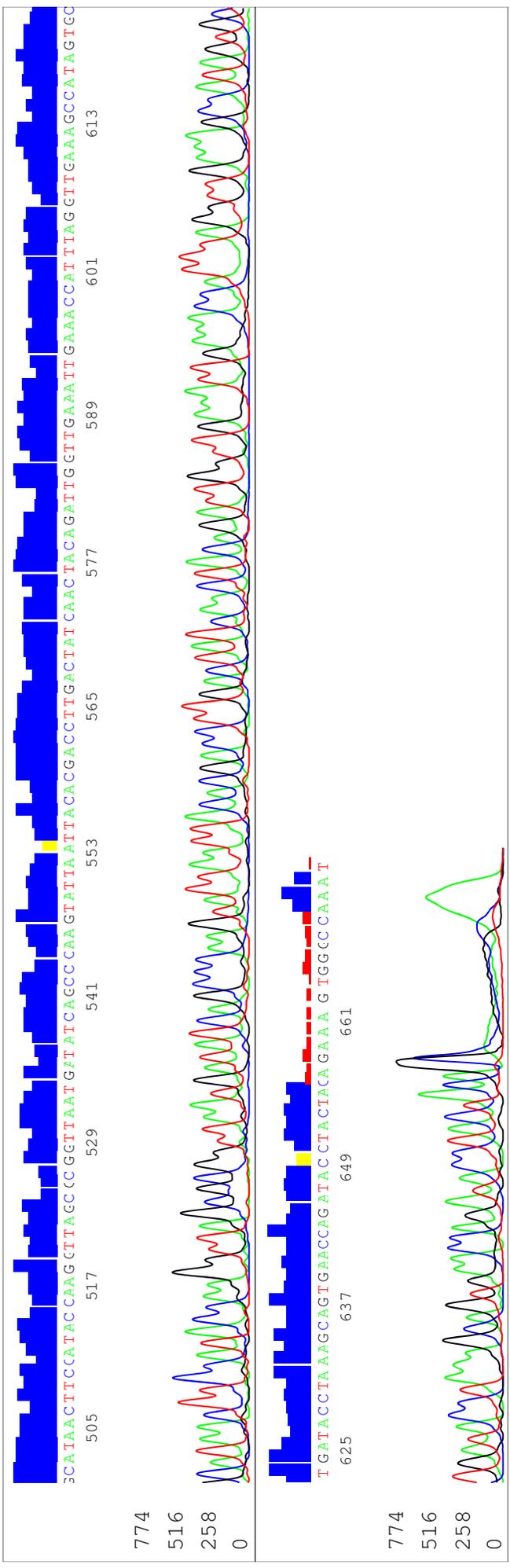


Tabela 2: Sítios polimórficos no genoma de cloroplasto de *Hancornia speciosa* baseados no espaçador intergênico *trnH-psbA*.

Haplótipos	Posição											Ft.	<i>H. speciosa</i> var.
	25	55	66	67	80	111	134	137	206	256	391		
H1	A	G	-	T	-	A	T	T	A	A	C	15	<i>pubescens</i>
H2	A	T	-	A	-	A	T	T	A	A	-	1	<i>gardneri</i>
H3	A	T	-	A	-	A	T	T	A	A	C	34	<i>gardneri</i>
H4	A	T	-	A	T	A	A	G	C	A	C	1	<i>speciosa</i>
H5	A	T	-	A	T	A	T	G	C	A	C	52	<i>speciosa</i>
H6	A	T	-	A	T	A	T	G	C	T	C	1	<i>speciosa</i>
H7	A	T	-	A	T	T	T	G	C	A	C	1	<i>speciosa</i>
H8	A	T	-	A	-	A	T	T	A	A	C	8	<i>cuyabensis</i>
H9	A	T	T	-	-	A	T	T	A	A	C	19	<i>gardneri</i>
H10	A	T	-	T	T	A	T	G	C	A	C	18	<i>speciosa</i>
H11	G	T	-	T	T	A	T	G	C	A	C	1	<i>speciosa</i>